НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ОРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ НАН УКРАЇНИ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Рік заснування – 1966

ЖУРНАЛ
ОРГАНІЧНОЇ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ХІМІЇ

JOURNAL
OF ORGANIC AND PHARMACEUTICAL CHEMISTRY

ЖУРНАЛ
ОРГАНИЧЕСКОЙ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

2015 – том 13, випуск 1 (49)

Харків
НФаУ

Головні редактори
В.І.Кальченко (Київ)
В.П.Черних (Харків)
Заступники головного редактора
І.С.Гриценко (Харків)
М.В.Вовк (Київ)
Відповідальні секретарі
Т.А.Костіна (Харків)
Т.І.Таранушина (Київ)

Редакційна колегія:

П.О.Безуглий (Харків), В.С.Броварець (Київ), Ж.Ф.Буйон (Руан, Франція), В.А.Георгіянц (Харків), О.І.Гризодуб (Харків), А.М.Демченко (Київ), В.Д.Дяченко (Луганськ), В.А.Загорій (Київ), А.Я.Ільченко (Київ), С.М.Коваленко (Харків), В.М.Ковальов (Харків), В.О.Ковтуненко (Київ), М.І.Короткіх (Донецьк), О.М.Костюк (Київ), В.П.Новіков (Львів), М.Д.Обушак (Львів), В.Д.Орлов (Харків), В.Ю.Пашинник (Київ), О.Б.Смолій (Київ), В.І.Станінець (Київ), А.О.Толмачов (Київ), І.В.Українець (Харків), А.А.Фокін (Київ), О.П.Швайка (Донецьк), Л.А.Шемчук (Харків), Ю.Л.Ягупольський (Київ)

Редакційна рада:

С.А.Андронаті (Одеса), І.С.Антипін (Казань), О.М.Біловол (Харків), О.О.Варнек (Страсбург, Франція), Ю.М.Воловенко (Київ), С.М.Десенко (Харків), Б.С.Зіменковський (Львів), Г.Л.Камалов (Одеса), А.Катц (Берклі, США), В.П.Кухар (Київ), А.Хаас (Бохум, Німеччина), В.П.Хиля (Київ), Ю.Г.Шермолович (Київ), О.В.Шишкін (Харків)

У журналі розглянуті проблеми синтезу та аналізу органічних та елементоорганічних сполук, аналогів природних сполук і лікарських субстанцій, результати фізико-хімічних досліджень у вищезазначених напрямках.

Для працівників науково-дослідних установ, вищих навчальних закладів та фахівців хімічного, фармацевтичного, біологічного, медичного і сільськогосподарського профілю.

"Журнал органічної та фармацевтичної хімії" за рішенням ВАК України внесено до переліку видань, рекомендованих для публікації матеріалів дисертацій зі спеціальностей: органічна хімія, елементоорганічна хімія, фармацевтична хімія і фармакогнозія (хімічні науки — постанова ВАК №1-05/1 від 10.02.2010 р.; фармацевтичні науки — постанова ВАК №1-05/2 від 10.03.2010 р.).

Затверджено до друку Вченою радою Інституту органічної хімії НАН України, протокол №5 від 23.02.2015 р.

Затверджено до друку Вченою радою Національного фармацевтичного університету, протокол №7 від 27.02.2015 р.

Адреса для листування: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, Національний фармацевтичний університет, редакція "Журналу органічної та фармацевтичної хімії", тел./факс (57) 706-30-63. E-mail: press@ukrfa.kharkov.ua

Передплатні індекси: для індивідуальних передплатників — 08383, для підприємств — 08384

Свідоцтво про державну реєстрацію серії КВ №7392 від 05.06.2003 р.

Підписано до друку 12.03.2015 р. Формат 60x84 1/8.
Папір офсетний. Друк ризо. Умовн. друк. арк. 9,3. Обліков.-вид. арк. 10,76. Тираж 100 прим.

Літературні редактори — О.Ю.Гурко, А.Л.Краснікова. Комп'ютерна верстка — О.М.Білинська.

Видавництво Національного фармацевтичного університету

"Журнал органічної та фармацевтичної хімії". Том 13, випуск 1 (49), 2015

ISSN 2308-8303

© Національний фармацевтичний університет, 2015

До 75-річчя ректора Національного фармацевтичного університету, члена-кореспондента Національної академії наук України, лауреата Державної премії України, доктора фармацевтичних наук, доктора хімічних наук, професора Валентина Петровича Черних

For the 75-th anniversary of the rector of the National University of Pharmacy, associate-member of the National Academy of Sciences of Ukraine, laureate of the State Prize of Ukraine, Doctor of Pharmacy, Doctor of Chemistry, professor Valentyn Petrovych Chernykh

5 січня 2015 року виповнилося 75 років ректору Національного фармацевтичного університету Валентину Петровичу Черних, члену-кореспонденту Національної академії наук України, лауреату Державної премії України, доктору фармацевтичних наук, доктору хімічних наук, професору. 2015 рік знаменний для Валентина Петровича ще й тим, що виповнюється 50 років його науково-педагогічної та громадської діяльності і 35 років перебування на посаді ректора.

Півстоліття життя віддано служінню благородній місії – підготовці фахівців для фармацевтичної галузі, підготовці наукових і науково-педагогічних кадрів, перебудові та реорганізації Національного фармацевтичного університету – головного фармацевтичного вищого навчального закладу України з історією, яка починалася у далекому 1805 році, реформуванню вищої фармацевтичної освіти та фармацевтичної галузі України.

В.П.Черних пройшов шлях від студента, аспіранта, асистента, доцента, професора, завідувача кафедри, декана, проректора з навчальної роботи до ректора Національного фармацевтичного університету.

Під керівництвом В.П.Черних Харківський фармацевтичний інститут пройшов складні етапи реорганізації від невеликого, маловідомого інституту до Національного фармацевтичного університету, який відповідає найвищим державним і міжнародним критеріям.

Сьогодні колектив університету налічує понад 20 тисяч співробітників і студентів. Під керівництвом видатного організатора Харківський фармацевтичний інститут, в якому навчалися 1600 студентів за однією спеціальністю «Фармація» та пра-

In January 5, 2015, Valentyn Petrovych Chernykh, rector of the National University of Pharmacy (NUPh), associate-member of the National Academy of Sciences of Ukraine, laureate of the State Prize of Ukraine, Doctor of Pharmacy, Doctor of Chemistry, professor turned 75. The Year 2015 is also significant for Valentyn Petrovych by the 50th anniversary of his scientific-pedagogical and social activities, and 35 years as the Rector.

Half a century of his life is devoted to the noble mission – training of specialists for the pharmaceutical industry, training of the research and academic staff, reconstruction and reorganization of the National University of Pharmacy, the main pharmaceutical higher school in Ukraine with the history dating back to the distant year 1805, reforming of the higher pharmaceutical education and pharmaceutical industry of Ukraine.

V.P.Chernykh had come a long way from a student, postgraduate student, teaching assistant, associate professor, professor, head of the Department, dean, vice-rector for academic affairs to the rector of the National University of Pharmacy, which he heads since 1980.

Under the leadership V.P. Chernykh the Kharkiv Pharmaceutical Institute passed the difficult stages of reorganization from a small, little-known institution to the leading National University of Pharmacy corresponding to the highest national and international criteria.

Today, the University community numbers over 20,000 employees and students. Under the leadership of an outstanding organizer the Kharkiv Pharmaceutical Institute, which had 1,600 students in one specialty «Pharmacy» with 6 Doctors of and 73 Candi-

цювали 6 докторів наук і 73 кандидати наук, виріс в унікальний науково-освітній комплекс – Національний фармацевтичний університет, в якому сьогодні навчаються 17 500 студентів за 14 спеціальностями та здійснюють науково-педагогічну діяльність 110 докторів наук і 500 кандидатів наук, середній вік яких становить 45 років. У 1991 р. Харківський фармацевтичний інститут одним із перших серед 900 ВНЗ отримав статус акредитованого на союзному рівні. У 1999 р. у першій п'ятірці ВНЗ України він набув статусу національного і став другим національним ВНЗ у м. Харкові.

Під керівництвом В.П.Черних здійснений кадровий «прорив» у НФаУ: з 1980 року підготовлено більше 130 докторів наук і 650 кандидатів наук. За рейтингом ЮНЕСКО серед 200 кращих університетів України НФаУ має один із найвищих показників якості науково-педагогічного потенціалу – 94%. За останні 15 років у НФаУ відкрито 13 нових спеціальностей, Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації, коледж. Протягом усього періоду управління університетом В.П.Черних сприяв забезпеченню його стабільного фінансового становища, створенню ефективної системи соціального захисту співробітників і студентів. НФаУ посідає лідерські позиції в Україні, в національному рейтингу він знаходиться на 2-му місці серед 18 медичних навчальних закладів і на третьому серед харківських університетів. Університет є флагманом фармацевтичної освіти серед навчальних закладів країн СНД. НФаУ нагороджений Почесною грамотою Кабінету Міністрів України за вагомий внесок у розвиток медичної та фармацевтичної науки і освіти. Це університет європейського рівня, визнаний у світі, який є дійсним членом міжнародних фармацевтичних та освітніх асоціацій. У 2013 р. НФаУ приєднався до Великої Хартії університетів. Будучи спеціалізованим ВНЗ, він забезпечує комплексну підготовку фахівців високої якості за всіма напрямами фармацевтичної галузі. У його аудиторіях отримали вищу фармацевтичну освіту понад 50 тисяч фахівців, серед яких понад 6 тисяч магістрів фармації для 82 країн світу. Підготовка фахівців для зарубіжжя – це вагомий чинник підвищення міжнародного іміджу нашої держави та освіти.

З метою реалізації державної політики кадрового забезпечення галузі В.П.Черних запропонував систему підготовки фахівців «на місцях» шляхом відкриття мережі з 20 фармацевтичних факультетів при медичних ВНЗ і забезпечення їх науково-педагогічними кадрами та навчально-методичною літературою. В університеті здійснюється підготовка науково-педагогічних кадрів для

dates of Sciences, grew up into a unique research and educational centre – National University of Pharmacy. Here at present 17,500 students study in 14 specialties, and 110 Doctors and 500 Candidates of Sciences with the average age of 45 carry out research and teaching activities. In 1991, the Kharkiv Pharmaceutical Institute was among the first 900 universities, which was accredited at the Union level. In 1999, it acquired the national status among the top five universities in Ukraine and became the second National University in Kharkiv.

There was a staff «breakthrough» at the NUPh under the supervision of V.P. Chernykh: more than 130 Doctors and 650 Candidates of Sciences have been trained since 1980. The NUPh has one of the highest indexes of the quality of research and educational potential – 94% among the top 200 universities in Ukraine according to the UNESCO rating. Over the past 15 years 13 new specialties, the Institute of Pharmacy Professionals Qualification Improvement and the College appeared in the structure of the NUPh. Within the whole period of his leadership V.P. Chernykh has promoted the stable financial position of the University, effective system of social protection of employees and students. Today the NUPh occupies leading positions in Ukraine; in the national ranking it takes the 2nd place among 18 medical universities and the 3rd among Kharkiv universities, and is the leader of pharmaceutical education among the educational institutions of the CIS countries. The NUPh was awarded by the honorary certificate of the Cabinet of Ministers of Ukraine for considerable contribution to the development of medical and pharmaceutical science and education. This University is of the European level, it is recognized in the world, and it is the active member of international pharmaceutical and educational associations. In 2013, the NUPh joined the Magna Charta Universitatum. Being a specialized higher school it provides comprehensive training of the high quality specialists in all areas of the pharmaceutical branch. Over 50,000 professionals, including more than 6,000 Masters of Pharmacy for 82 countries, received higher pharmaceutical education in its lecture halls. Training of specialists for foreign countries is a significant factor in increasing the international image of our country and our education.

In order to implement the national policy of human resourcing of the branch V.P. Chernykh proposed the system of in-service training of specialists by opening a network of 20 pharmaceutical faculties at the medical universities, providing them with the research and teaching staff, methodological and teaching materials. The University trains the academic

фармацевтичних факультетів ВНЗ, практичної фармації України та зарубіжних країн.

Уперше в системі фармацевтичної освіти України створені навчально-методичні комплекси навчальної літератури з усіх дисциплін обсягом понад 2 тис. найменувань. Навчальний процес на 100% забезпечений навчально-методичною літературою державною та іноземними мовами, яка використовується на всіх фармацевтичних факультетах України та деяких країн СНД. Наукова спадщина університету – це понад 490 підручників і навчальних посібників, 300 монографій, більше 1500 охоронних документів на винаходи. Вченими НФаУ розроблено і впроваджено у виробництво 261 новий лікарський препарат.

В.П.Черних є ініціатором і одним з авторів розробки Концепції розвитку фармацевтичної галузі та освіти України, розширення спектра спеціальностей для фармацевтичної галузі, основоположником новітнього напряму в фармації: фармацевтичної опіки хворих, системи контролю якості ліків, у т.ч. впровадження біоеквівалентності на засадах належної клінічної практики відповідно до світових вимог.

Для підвищення авторитету та визнання на державному рівні фармацевтичної галузі за ініціативи та безпосередньої участі В.П.Черних в Україні встановлено професійне свято – День фармацевтичного працівника (з 1999 р.), запроваджено нову державну нагороду – почесне звання «Заслужений працівник фармації України» (2005 р.), прийнято Етичний кодекс фармацевтичного працівника України (2010 р.), створено першу в світі Фармацевтичну енциклопедію (перше видання – 2005 р., друге – 2010 р.). Під безпосереднім керівництвом В.П.Черних культурна скарбниця Харківщини збагатилася унікальною скульптурною композицією «Фармація у віках» – першим у світі пам'ятником фармацевту. В.П.Черних став ідеологом зміцнення галузі та організатором проведення на базі університету V, VI і VII Національних з'їздів фармацевтів України і створення Фармацевтичної асоціації України.

В.П.Черних – видатний вчений в галузі органічної хімії, праці якого широко відомі науковій спільноті України і зарубіжжя, є автором 1260 наукових праць, серед яких перший підручник для вищої фармацевтичної освіти України «Органічна хімія» в 3-х томах, удостоєний Державної премії України в галузі науки і техніки в 2000 р. За його ініціативи заснований новий науковий напрям – синтез біологічно активних речовин – похідних дикарбонових кислот, створення на їх основі різних гетероциклічних структур і дослідження шляхів циклізації поліфункціональних реагентів.

and teaching staff for pharmaceutical faculties, practical pharmacy in Ukraine and abroad.

For the first time in the pharmaceutical education of Ukraine complexes of the teaching materials in all disciplines of more than 2 thousand items were created. The teaching and learning activities are provided by 100% with educational and methodological materials used by all the pharmaceutical faculties in Ukraine and some CIS countries in official and foreign languages. The scientific heritage of the University is more than 490 textbooks and study guides, 300 monographs, over 1,500 titles of protection for inventions. The NUPh scientists developed and introduced into production 261 new medicines.

V.P. Chernykh is an initiator and one of the authors of the Pharmaceutical branch development conception in the field of education and science in Ukraine, extension of the range of specialties for the pharmaceutical branch; the founder of the up-to-date direction in pharmacy – pharmaceutical care of patients, the drug quality control system, including implementation of bioequivalence on the principles of good clinical practice in accordance with international requirements.

To gain the influence and recognition of the pharmaceutical branch at the State level at the initiative of V.P. Chernykh the Pharmacist's Day (1999) became an official State professional holiday in Ukraine; the new honorary title "Honoured pharmacist of Ukraine" (2005) was introduced; the Code of Ethics for Pharmacists of Ukraine (2010) was adopted; the world's first Pharmaceutical encyclopedia (the first edition of 2005, the second edition of 2010) was created. Under the direct supervision of V.P. Chernykh the cultural treasury of the Kharkiv region has been enriched with a unique sculptural complex "Pharmacy in centuries", the first in the world monument to the pharmacist. V.P. Chernykh became the ideologist of the pharmaceutical branch growth and the organizer of the V, VI, and VII National Congresses of Pharmacists of Ukraine and the Pharmacy Association of Ukraine.

V.P. Chernykh is an outstanding scientist in the field of organic chemistry, his works are well known to the scientific community in Ukraine and abroad; he is the author of 1260 scientific publications, including the textbook «Organic Chemistry» in 3 volumes, which was awarded the State Prize of Ukraine in Science and Technology in 2000, and the first textbook for higher pharmaceutical education in Ukraine. A novel scientific approach – synthesis of biologically active substances – derivatives of dicarboxylic acids, creation of various heterocyclic structures on their basis and research of the cyclization routes for polyfunctional reagents in the heterocycle assembly was founded. Novelty and priority of the research are confirmed by 126 patents of Ukraine and Russia,

тів в ансамблі гетероциклів. Новизну і пріоритетність наукових досліджень підтверджують 126 патентів України та Росії, 341 авторське свідоцтво. Більше 40 років віддано підготовці докторів і кандидатів наук для вищої школи і практичної фармації, створена вітчизняна школа хіміків-синтетиків, у рамках якої вченим підготовлено понад 60 докторів і кандидатів наук, а також (особисто та з учнями) створено 16 лікарських препаратів.

За підсумками багаторічних наукових досліджень в області синтезу біологічно активних речовин у 1997 р. професор В.П.Черних був обраний членом-кореспондентом НАН України. В історії фармації України ця подія стала першим прикладом представництва фармації в академічній науці. За наукові досягнення Президія академії наук України нагородила В.П.Черних в 2013 р. почесним знаком НАНУ.

В.П.Черних – відомий державний і громадський діяч, ініціатор видання 7 наукових журналів ВАК України. Впродовж 30 років він працював в Експертних радах ВАК СРСР та України. На теперішній час він очолює Експертну проблемну комісію «Фармація» МОЗ та НАМН України, є головою Науково-методичної комісії з фармації Міністерства освіти і науки України, членом Вченої ради ДП «Державний фармакологічний центр» МОЗ України, членом Президії Фармакопейного Комітету МОЗ України, членом Вченої медичної ради МОЗ України, членом бюро Державного фармакологічного центру з реєстрації ЛЗ і ЛП, членом секції хімії та хімічної технології Комітету з Державних премій в галузі науки і техніки, членом колегії Держінспекції з контролю якості лікарських препаратів МОЗ України. В.П.Черних – віцепрезидент Фармацевтичної асоціації України, президент Фармацевтичної асоціації Харківщини. Обирався депутатом Київської районної ради народних депутатів м. Харкова (1986 р.) і міської Ради народних депутатів (1985-1987 рр.). У 1999 р. Міжнародний біографічний центр та Американський біографічний інститут визнали В.П.Черних одним із 500 найбільш впливових і видатних учених світу, який здійснює активну міжнародну та просвітницьку діяльність.

Плідна праця та видатні заслуги відомого вченого, педагога, організатора, державного і громадського діяча були неодноразово відзначені державою: він нагороджений орденами «Знак пошани», «Трудового Червоного Прапора», орденами України «За заслуги» I, II, III ступенів, князя Ярослава Мудрого IV і V ступенів, Почесною грамотою Верховної Ради України, почесними грамотами та відзнаками МОЗ та МОН України «Від-

341 certificates of authorship. More than 40 years are devoted to training of Doctors and Candidates of Sciences for higher education and practical pharmacy; the national school of synthetic chemists was founded; its scientists trained more than 60 Doctors and Candidates of Sciences, and (individually and together with students) created 16 medicines.

In 1997, professor V.P. Chernykh was elected an associate-member of NAS of Ukraine according to the results of long-term research in the field of the synthesis of biologically active substances. In the history of pharmacy of Ukraine this event was the first example of representation of pharmacy in the academic science. In 2013, the Presidium of the Academy of Sciences of Ukraine awarded V.P. Chernykh a badge of honour of NAS for scientific achievements.

V.P. Chernykh is a well-known statesman and public figure, initiator of the publication of 7 VAK (Higher Attestation Commission) scientific journals of Ukraine. For over 30 years he worked in the VAK Expert Councils of the USSR and Ukraine. Currently he heads the Expert Problem Commission «Pharmacy» at the Ministry of Public Health and NAMS of Ukraine; he is the chairman of Pharmacy Scientific-Methodological Commission at the Ministry of Education and Science of Ukraine, a member of the Scientific Council of the State Enterprise «State Pharmacological Centre» at the MPH of Ukraine, a member of the Presidium of the Pharmacopoeian Committee at the MPH of Ukraine, a member of the medical Scientific Council at the MPH of Ukraine, a member of the agency of the State Pharmacological Centre for Drug Registration, a member of the subdivision of Chemistry and Chemical Technology of the Committee on State Prizes in Science and Technology, a member of the Board of the State Inspectorate for Drug Quality Control at the MPH of Ukraine. V.P. Chernykh is a vice-president of the All-Ukrainian Association of Pharmacists, the president of the Kharkiv Pharmacy Association. He was elected a deputy of the Kyiv District Council of People's Deputies of Kharkiv (1986) and the City Council of People's Deputies (1985-1987). In 1999, the International Biographical Centre and American Biographical Institute recognized V.P. Chernykh as one of the 500 most influential and prominent scientists in the world. He is actively engaged in international and educational activities.

Fruitful work and outstanding achievements of the famous scientist, educator, organizer, statesman and public figure were repeatedly marked by the state: he was awarded the Order «Badge of Honour», «Red Banner of Labour», Order of Ukraine «For Merit» of the I-st, II-nd, III-d classes, Prince Yaroslav the Wise of the IV-th and V-th class, Diploma of the Verkhovna Rada of Ukraine, honorary certificates and merit badges of the Ministry of Public health and Ministry of Education and Science of Ukraine, «Ex-

мінник охорони здоров'я», «Відмінник освіти України», «Винахідник СРСР», «Петро Могила», відзнакою Харківської облдержадміністрації «Слобожанська слава», йому були присвоєні почесні звання «Заслужений винахідник УРСР», «Заслужений діяч науки і техніки УРСР». Харківська громадськість обрала В.П.Черних Почесним громадянином м. Харкова.

cellent Worker of Healthcare», «Excellent Worker of Education of Ukraine», «Inventor of the USSR», «Petro Mohyla», badge of merit of the Kharkiv Regional State Administration «Sloboda glory» («Slobodska slava»), such honorary titles as «Honoured Inventor of the USSR», «Honoured worker of Science and Technology of the UkrSSR.» The Kharkiv community elected V.P. Chernykh the honorary citizen of Kharkiv.

Науково-педагогічна та академічна громадськість, колектив і студенти Національного фармацевтичного університету, колеги, друзі, учні від щирого серця вітають відомого вченого, талановитого педагога, видатного організатора і реформатора вищої фармацевтичної освіти, невтомного ентузіаста і патріота фармації, який є яскравим прикладом відданого служіння інтересам освіти, науки, здоров'я людей, інтересам нашої славної України.

Нових Вам, Валентине Петровичу, звершень і злетів, невичерпного творчого натхнення та довголіття!

Scientific-pedagogical and academic community, the staff and students of the National University of Pharmacy, colleagues, friends, followers heartily congratulate the famous scientist, talented educator, outstanding organizer and reformer of higher pharmaceutical education, tireless enthusiast and patriot of the pharmacy, who is a perfect example of devotional service to the interests of education, science, health, to the interests of our glorious Ukraine.

We wish you, Valentyn Petrovych, new achievements and starts, inexhaustible creative inspiration and longevity!

Коли верстався номер!

6 березня 2015 року на загальних зборах НАН України ректора Національного фармацевтичного університету професора Черних В.П. було обрано дійсним членом (академіком) НАН України зі спеціальності хімія лікарських сполук. Це знакова подія в житті університету і фармації в цілому.

Шановний Валентине Петровичу! Фармацевтична спільнота, викладачі та студенти Національного фармацевтичного університету щиро вітають Вас з цією знаменною подією і бажають доброго здоров'я, нових досягнень та відкриттів!

While composing the issue!

In March, 6, 2015 the rector of the National University of Pharmacy, professor Chernykh V.P. was elected as an active member (academician) of the National Academy of Sciences of Ukraine in the speciality of Chemistry of Medicinal Compounds at the general meeting of the NAS of Ukraine. This is a momentous event in the life of the University and pharmacy in general.

Dear Valentin Petrovich! Pharmacy community, teachers and students of the National University of Pharmacy sincerely congratulate You with this landmark event and wish You good health, new achievements and discoveries!

UDC 547.789.69

METHODS OF SYNTHESIS AND PROPERTIES OF THIAZOLOPYRIDINES

T.I.Chaban

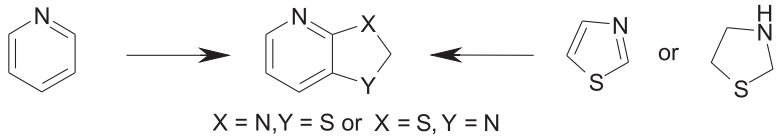
Lviv National Medical University named after Danylo Halytsky

Key words: thiazolopyridine; synthesis; properties; condensed; pharmacological activity

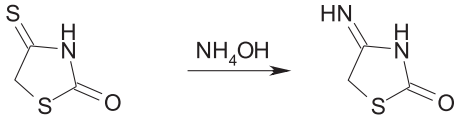
The review systematizes the theoretical and experimental data concerning methods of synthesis of condensed thiazolopyridines, which at present have been insufficiently studied, the prospects for their application in the directed synthesis of new physiologically active substances. The recent developments in their pharmacology have been also analyzed. The available methods for the synthesis of condensed thiazolopyridines can be divided into two fundamentally different approaches. The first approach is based on annelation of the thiazolidine or thiazole cycle to the pyridine ring, and the second one use pyridine derivatives as starting materials; their functional groups make it possible to change the pyridine ring. Methods for obtaining thiazolopyridines using solid media carriers, and their synthesis with domino reactions deserve a particular attention. Generalization of the scientific data published confirms that the condensed thiazolopyridines exhibit various biological effects. In particular, they are characterized by analgesic, anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant and antifungal activities. Due to the inhibitory action on integrally linked kinase the specified class of compounds can eliminate the hyperproliferative disorders in the living organisms. It has been found that these derivatives exhibit the antidiabetic, antibacterial and anti-tuberculosis action. It is known that derivatives of thiazolopyridines have shown a positive effect in the treatment of sexual dysfunction. Thiazolopyridine derivatives containing the α-amino phosphonate residue at 2 position of the basic heterocycle exhibit a significant anticancer effect.

МЕТОДИ СИНТЕЗУ ТА ВЛАСТИВОСТІ ТІАЗОЛОПІРИДИНІВ
Т.І.Чабан
Ключові слова: *тіазолопіридини; синтез; властивості; анелювання; фармакологічна активність*
В огляді систематизовано теоретичний та експериментальний матеріал з методів синтезу маловивчених на сьогодні конденсованих тіазолопіридинів, перспективи їх використання при спрямованому синтезі нових фізіологічно активних речовин, а також проаналізовані останні досягнення у фармакології зазначеної групи гетероциклів. Існуючі методи синтезу конденсованих тіазолопіридинів можна умовно поділити на два принципово різних підходи, перший з яких грунтується на анелюванні тіазолідинового або тіазольного циклу до піридинового ядра, а за другим способом як вихідні речовини використовують похідні піридину, функціональні групи яких дають можливість добудувати ядро піридину. Заслуговують на увагу способи добування тіазолопіридинів з використанням твердофазних носіїв, а також їх синтез із застосуванням методів доміно-реакцій. Узагальнення літературних даних дають підстави стверджувати, що для конденсованих тіазолопіридинів властива різнопланова біологічна активність. Зокрема, для них характерними є аналгетична, протизапальна, антимікробна, антиоксидантна та протигрибкова активність. За рахунок інгібуючої дії на інтегрально зв'язану кіназу, вказаний клас сполук здатен усувати гіперпроліферативні порушення у живих організмах. Встановлено, що зазначені похідні проявляють протидіабетичну, антибактеріальну та протитуберкульозну дію. Відомо, що похідні тіазолопіридинів виявили позитивний ефект для усунення статевої дисфункції. Також похідні тіазолопіридину, які вміщують у положенні 2 базового гетероциклу α-амінофосфонатний залишок, виявляють значний протиракoвий ефект.

МЕТОДЫ СИНТЕЗА И СВОЙСТВА ТИАЗОЛОПИРИДИНОВ
Т.И.Чабан
Ключевые слова: *тиазолопиридины; синтез; свойства; аннелирование; фармакологическая активность*
В обзоре систематизированы теоретический и экспериментальный материал по методам синтеза малоизученных на сегодня конденсированных тиазолопиридинов, перспективы их использования при направленном синтезе новых физиологически активных веществ, а также проанализированы последние достижения в фармакологии указанной группы гетероциклов. Существующие методы синтеза конденсированных тиазолопиридинов можно условно разделить на два принципиально разных подхода, первый из которых основан на аннелировании тиазолидинового или тиазольного цикла к пиридиновому ядру, а по второму способу в качестве исходных веществ используют производные пиридина, функциональные группы которых дают возможность достраивать ядро пиридина. Заслуживают внимания способы получения тиазолопиридинов с использованием твердофазных носителей, а также их синтез с применением методов домино реакций. Обобщение литературных данных дает основание утверждать, что для конденсированных тиазолопиридинов свойственна разноплановая биологическая активность. В частности, для них характерны анальгетическая, противовоспалительная, антимикробная, антиоксидантная и противогрибковая активность. За счет ингибирующего действия на интегрально связанную киназу указанный класс соединений способен устранять гиперпролиферативные нарушения в живых организмах. Установлено, что указанные производные проявляют противодиабетическое, антибактериальное и противотуберкулезное действие. Известно, что производные тиазолопиридинов проявили положительный эффект для устранения половой дисфункции. Также производные тиазолопиридина, содержащие в положении 2 базового гетероцикла α-аминофосфонатный остаток, проявляют значительный противораковый эффект.



Scheme 1



Scheme 2

The fundamental aspects of chemistry and pharmacology of 4-thiazolidones were elucidated in a number of review publications [1, 2, 3, 4], while the information concerning the chemistry of fused thiazoles with the exception for condensed benzothiazoles possessed a sporadic character. Thiazolopyridines are also insufficiently studied, while they are of greater interest from the point of their physiological action if compared with their monocyclic constituents.

There are two fundamentally different methods of the thiazolopyridine system construction. The first method is based on annelation of the thiazolidine or thiazole cycle to the pyridine ring. As to the second one, the pyridine derivatives are used as precursors for the thiazole ring construction on account of their functional groups (Scheme 1).

Methods for the synthesis of thiazolopyridines by modification of thiazolidone-4 and thiazole derivatives. The convenient method for the synthesis of 3*H*-thiazolo[4,5-*b*]pyridine-2-one derivatives is the use of 4-iminothiazolidin-2-one as a starting substance firstly obtained by I.D. Komaritsa by heating iso-rhodanine with 25% NH_4OH [6] (Scheme 2).

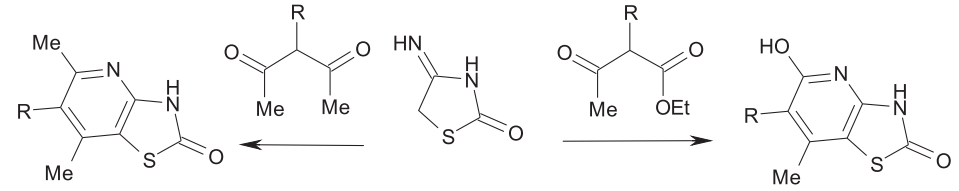
The interaction of the substance mentioned above with some β-carbonyl compounds leads to formation of the hard-to-get 3*H*-thiazolo[4,5-*b*]pyridines with the yield of 79-100% [7-10] (Scheme 3).

One of the methods of the pyridine cycle annelation to the thiazole ring is based on the three-component condensation of 4-aminothiazole derivatives with both aromatic or aliphatic aldehydes and Meldrum acid. The yield of the target products is equal to 44-65% [11-15] (Scheme 4).

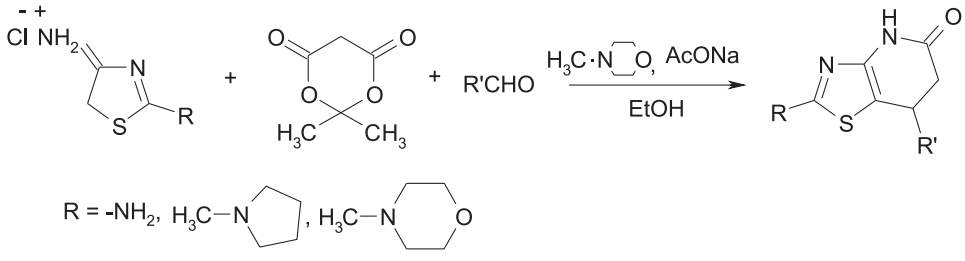
The cyclization of 4-formylamino-5-acyl substituted thiazoles either with bases or with acetic acid leads to 7-hydroxy-2-(methylsylfanyl)-thiazolo[4,5-*b*] pyridines with the yield of 70% [16] (Scheme 5).

Under the condensation of 4-amino-5-benzoyl-2-phenylthiazoperchlorate with ketones at 130-150°C, thiazolo[4,5-*b*]pyridines with the yields of 46-64% are formed [17] (Scheme 6).

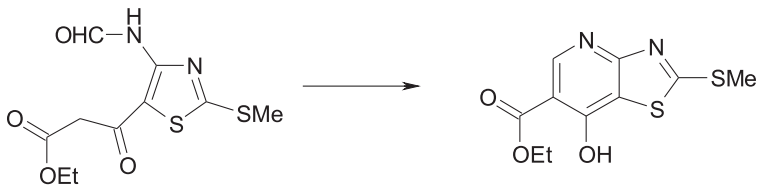
5-Aminothiazoles with the unoccupied C^4 position can interact with diethyletoximethylenemalonate forming the intermediate, which when heating



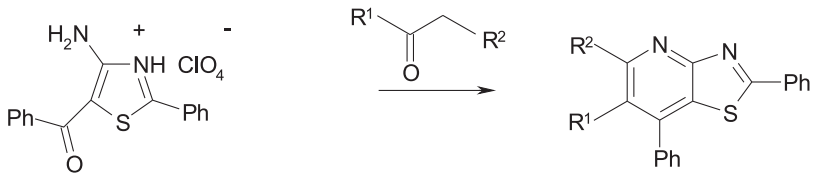
Scheme 3



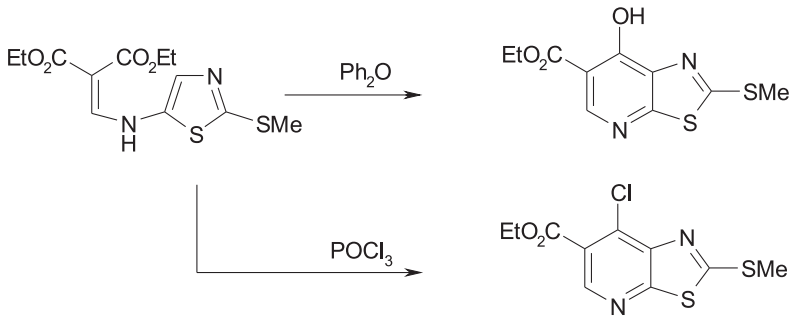
Scheme 4



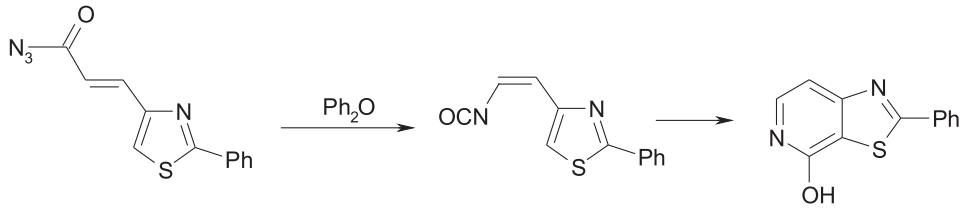
Scheme 5



Scheme 6



Scheme 7



Scheme 8

undergoes cyclization to form thiazolopyridine with the yield of 90%, while in interaction with $POCl_3$, the chlorine derivative of this thiazolopyridine is obtained with the yield of 53% [18] (Scheme 7).

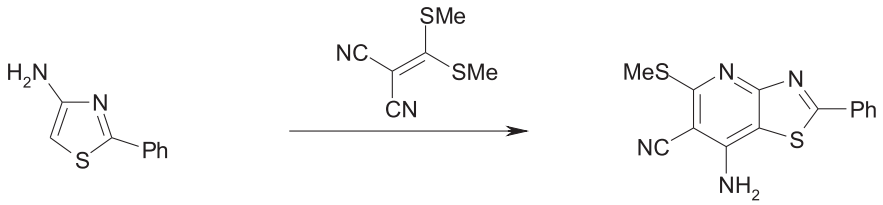
Isocyanate is commonly prepared by heating 2(E)-3-(2-phenyl-1,3-thiazole-4-yl)acryliozide in biphenyl ether, then it is cyclized into phenylthiazolopyridine-4-ol with the yield that exceeds the level of 90% [19] (Scheme 8).

Due to the interaction of bis(methylthio) methylenemalononitrile with 4-amino-2-phenylthiazole, thiazolopyridine is obtained [20] (Scheme 9).

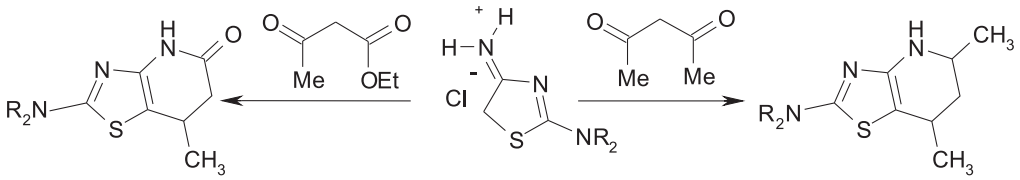
The use of acetoacetic ether in the reaction with 2,4-diamino-thiazoles and acetylacetone, 2-amino-7-5,7-dimethylthiazolo[4,5-*b*]pyridine and 2-amino-7-methyl-4*H*-thiazolo[4,5-*b*]pyridine-5-ones were obtained [21] (Scheme 10).

The accessible method for obtaining of thiazolo [4,5-*b*]pyridines is the use of 2-(5-aryliden-4-oxo-2-thioxothiazolidine-3-ilamino)-N-aryl-2-thioxoacetamides as the starting substances. When boiling the given derivatives with ethyl cyanoacetate in the ammonium acetate solution in acetic acid within 4 hours, the substituted 2-thioxothiazolopyridine-6-carbonitryls are obtained with the yields of 50-55%. The yields of the abovementioned heterocycles may be considerably increased with the use of micro-wave irradiation. While carrying out this particular reaction and due to the micro-wave irradiation the corresponding 5-oxo-2-thioxo-6-cyano-4,5,6,7-tetra-hydrothiazolo[4,5-*b*]pyridines are prepared with the yield of 88-92% [22, 23] (Scheme 11).

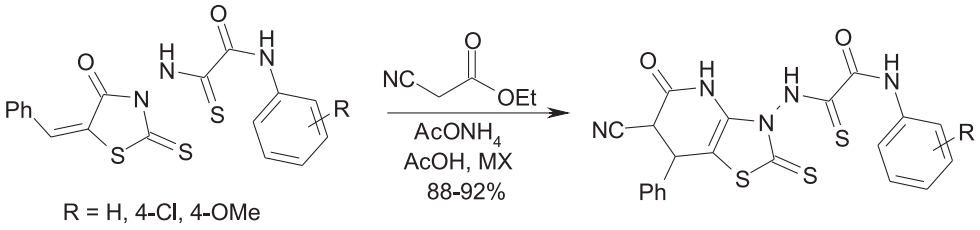
Among the methods of the thiazolo[4,5-b]pyridine system construction, the cyclocondensation based



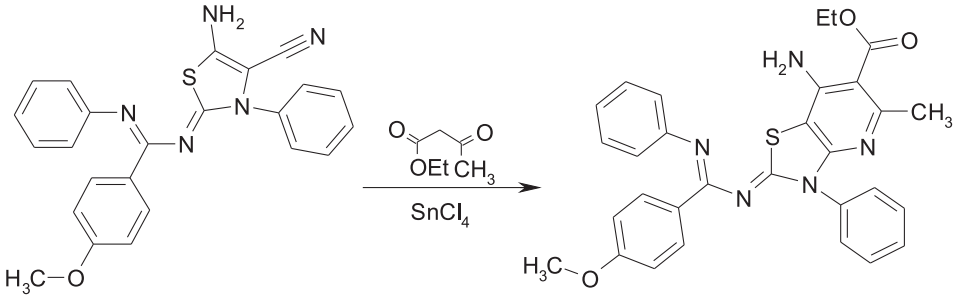
Scheme 9



Scheme 10



Scheme 11



Scheme 12

on the substituted 4-amino-5cyano-2,3-dihydro-1,3-1,3-triazoles proceeding with the participation of the enaminonitrile fragment is worth noting [24-25]. The abovementioned reaction is carried out when heating N-(5-amino-4-cyano-3-phenyl-3H-thiazolo-2-ilden)-4-metoxo-N-N-phenylbezamidine with the aceto-acetic ester or cyclohexanone in the presence of tin tetrachloride in 1,2-dichloroethane within 5-6 hours and results in formation of ethyl ester of 7-amino-2-(4-methoxo-N-phenyl-benzimidoilmino)-5-methyl-3-phenyl-2,3-dihydrothiazole[4,5-b]pyridine-6-carboxylic acid with the yields greater than 80% (Scheme 12).

Taking into account the interaction of 6-(4-chlorophenyl)-3-phenylthiazolo[4,5-*e*][1,2,4]triazene with bicyclo[2,2,1]hepta-2,5-diene, M.M.Krayushkin with co-authors [26, 27] initiated an original method of synthesis of the problematic thiazolopyridines. This reaction is carried out under high pressure in the presense of lithium perchlorate as a catalyst. The yield of 2-(4-chlorophenyl)-5phenylthiazolo[4,5-*b*]pyridine in this case is equal to 97% (Scheme 13).

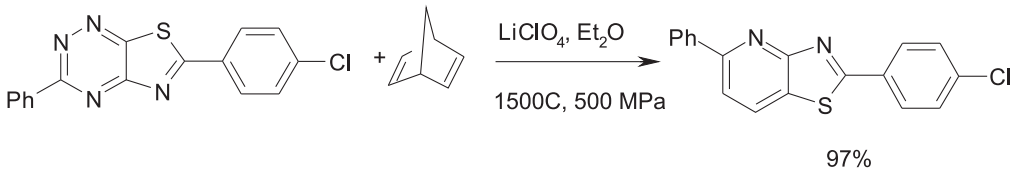
V.O.Iaroshenko and co-authors [28] in order to obtain thiazolopyridines suggested the interaction of 2-aminothiazole-4(5*H*)-imine salts with different 1,3-CCC-dielectrophils; it led to the target compounds with the yields in the range of 14-85% (Scheme 14).

A great number of reactions of conjugated thiolatonitriles with 2-bromide-1-arylethylidenemalononitriles leads to obtaining 2,5-diamino-7-phenylthiazolo[4,5-*b*]pyridine-6-carbonitrile derivatives with high yields [29, 30] (Scheme 15).

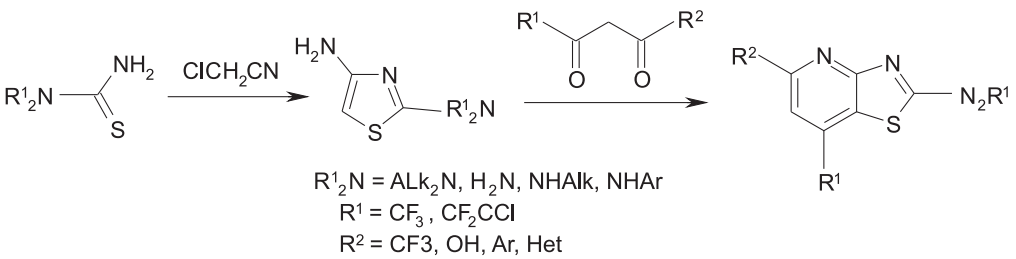
Methods of the thiazolopyridine synthesis by transformation of pyridine derivatives. The structure of the thiazolidine ring by means of cyclization of the functional groups of pyridine that results in formation of thiazolopyridines is widely elucidated and represented in a vast majority of publications.

The interaction of 2-mercapto-3-aminopyridines obtained from the corresponding chloraminopyridines with acids or with their anhydrides results in thiazolopyridines formation with the yields of 60-70% [31, 32] (Scheme 16).

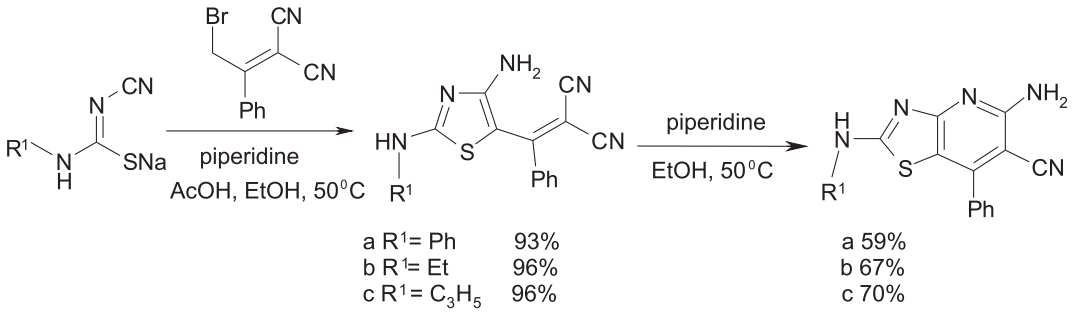
While carrying out the reactions of 3-amino-2-chlorpyridines with *ortho*-alkylthiocarboxylic acids esters at first the amino group is activated by N-methylation with ethylmagnesiumbromide, butyllithium



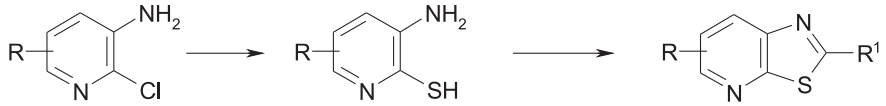
Scheme 13



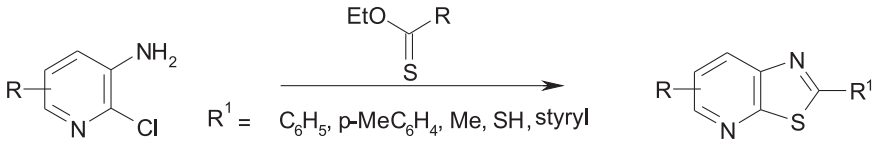
Scheme 14



Scheme 15



Scheme 16



Scheme 17

or sodium hydride, then it is treated by thioesters. The yields of the target compounds in this case are equal to 70% [33-35] (Scheme 17).

Thioureas obtained from aminochlorpyridines and alkyl-, aryl- or ethoxycarbonyl isothiocyanate undergo further cyclization with the chlorine atom replacement. The yields of the final thiazolopyridines are equal to 60-70% [36-38] (Scheme 18).

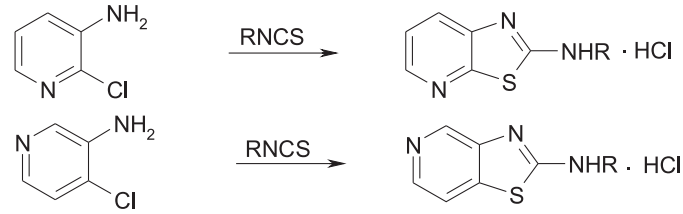
Thiazolopyridines were obtained from thiourea of pyridine series when treating with bromine generated with HBr in DMSO [39] (Scheme 19).

5-Amino-2-chlorpyridine is transformed into 2-aminothiazolopyridine with the yield of 91% by means of interaction with sodium rhodanide in the presence of bromine in acetic acid [40] (Scheme 20).

The interaction of 3-amino-1*H*-tetrazol-5-ylsulfanil-substituted pyridines with hydrochloric acid in ethanol results in formation of 2-aminothiazolo[5,4-*b*]pyridines with the yield of 40-80% [38] (Scheme 21).

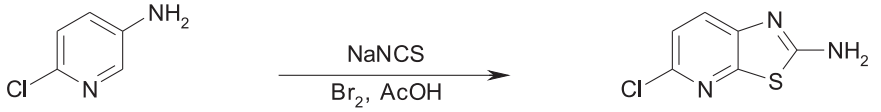
In cyclization of pyridyldithiocarbomates with alkalis in ethanol the mixture of thiazolopyridinthiol (86%) and N,N-diisopropylthiazolopyridin-2-amine (14%) [41, 42] is obtained (Scheme 22).

As the result of *ortho*-amino(diisopropyldithiocarbomato)pyridines treatment with carboxylic acid in the presence of $POCl_3$, thiazolo[4,5-*b*]pyridines or

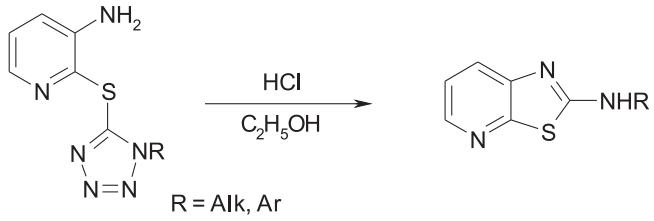


Scheme 18

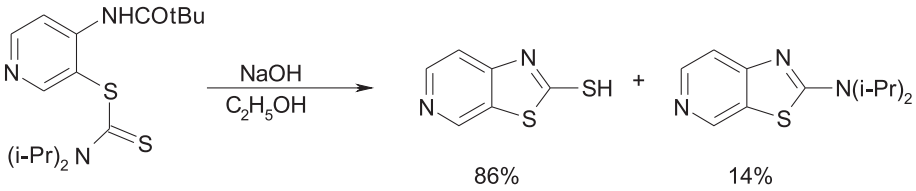
Scheme 19



Scheme 20



Scheme 21



Scheme 22

thiazolo[5,4-*c*]pyridines with moderate yields [43] are obtained (Scheme 23).

Similarly, 2-substituted thiazolo[4,5-*b*]pyridines are obtained when treating *ortho*-amino(diisopropyldithiocarbamato)pyridines with acid chlorides in dichlormethane in the presence of triethylamine with subsequent boiling in hydrochloric acid [44].

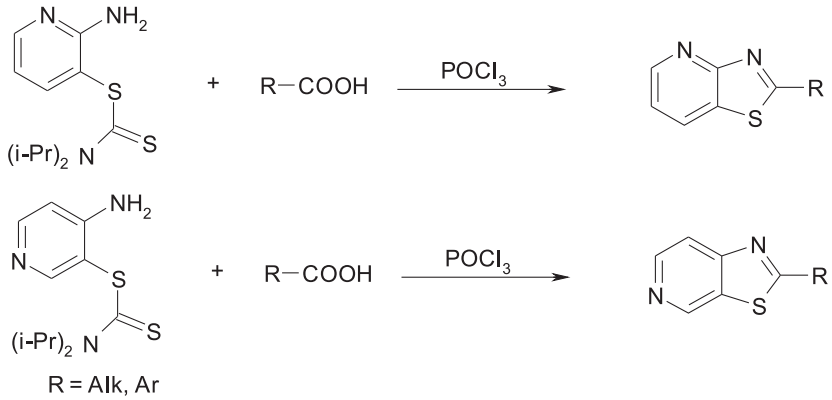
Thiazolo[5,4-*c*]pyridine was obtained with the help of a multistage reaction with *tert*-butyloxycarbonylaminopyridine. The amide cyclization is performed by heating in formic acid with the yield of 20% [44] (Scheme 24).

Starting with *ortho*-nitrochlorpyridines, 2-methyl-1,3-thiazolo[4,5-*b*]- and thiazolo[4,5-*c*]pyridines [40] were obtained. The aim was to determine the effect of their derivatives on the Koch's bacillus [45, 46]. The reaction occurs *via* the stage of disulfide formation with its further reduction by zinc. The yields of 2-methyl-1,3-thiazolo[4,5-*b*]- and thiazolo[4,5-*c*] pyridines are about 50% (Scheme 25).

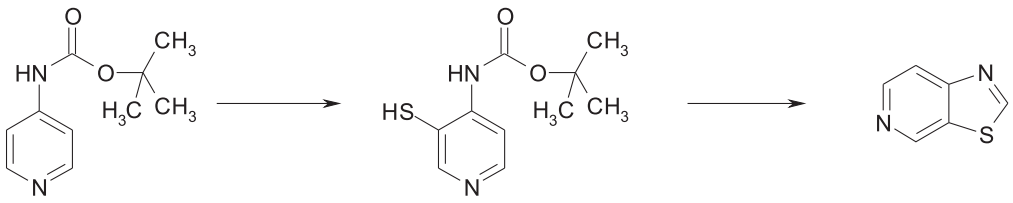
One of the promising methods of the thiazolopyridine synthesis is the use of 2-chloro-3-nitropyridine and 4-chloro-3-nitropyridine. K.Walczyn´ski and co-authors [47] while treating the abovementioned compounds by hydrogen sulfide in the aqueous solution of sodium hydroxide in the presence of sodium sulfide and carbon bisulfide were successful in obtaining thiazolopyridine-2-thiones; the methylation of them by methyl iodide in the dimethyl ether ethylene glycol medium results in 2-methylsulfanilthiazolopyridines (Scheme 26).

These authors also suggest to use N-(3-and N-(5-diisopropylthiocarbomoyl-pyridine-2-yl)-2,2 dimethyl-propionamides, which in the result of hydrolysis in 20% ethanol solution of sodium hydroxide form the target thiazolopyridine, while their further methylation leads to the corresponding 2-methylsulfanilthiazolopyridines (Scheme 27).

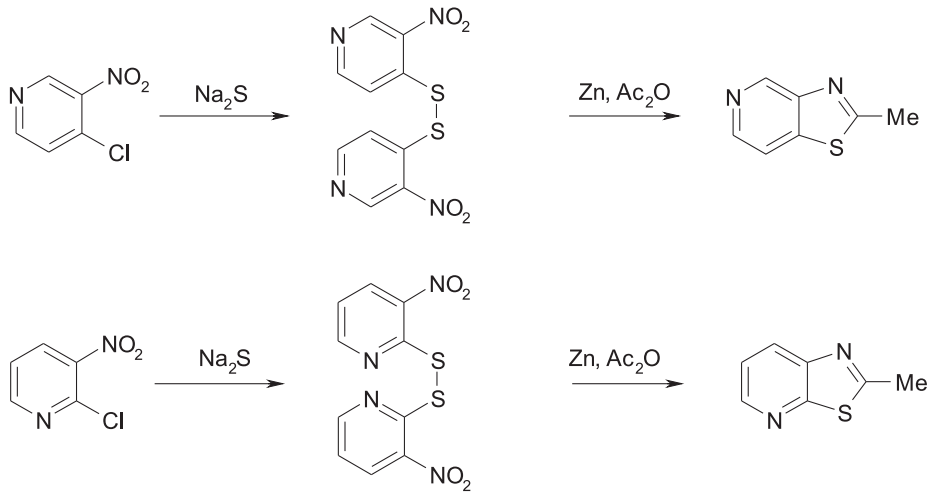
In order to find the substances with the anticancer activity Gu L. and co-authors developed the me-



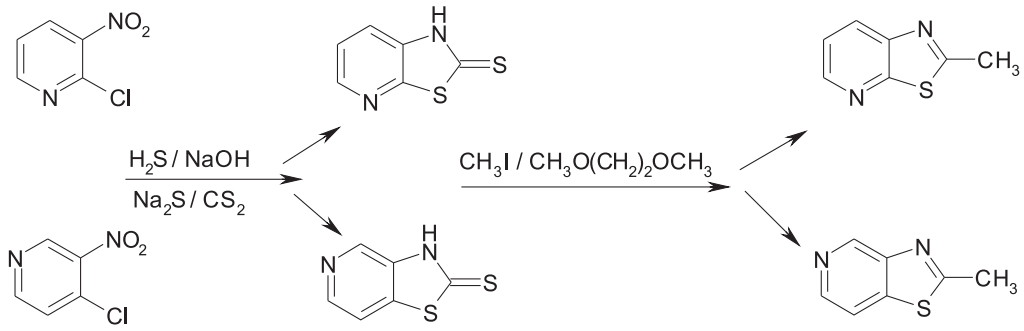
Scheme 23



Scheme 24



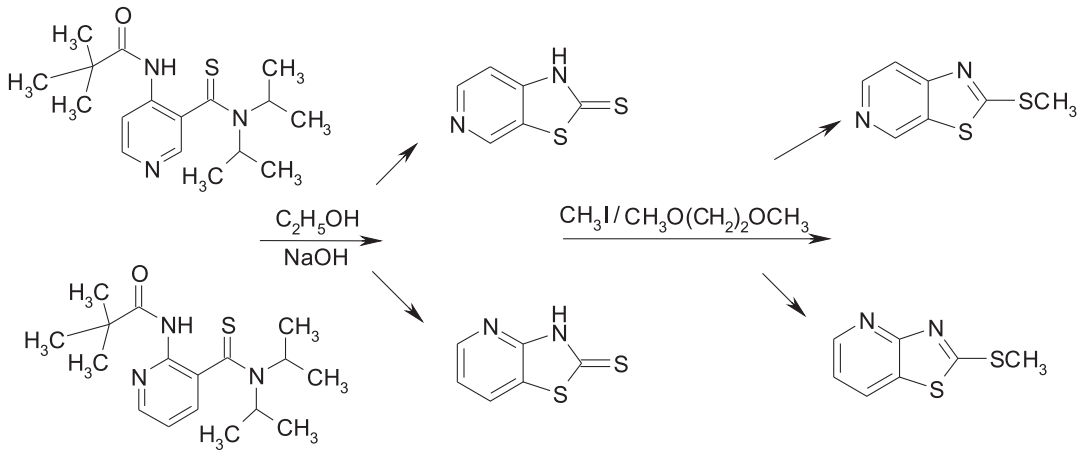
Scheme 25



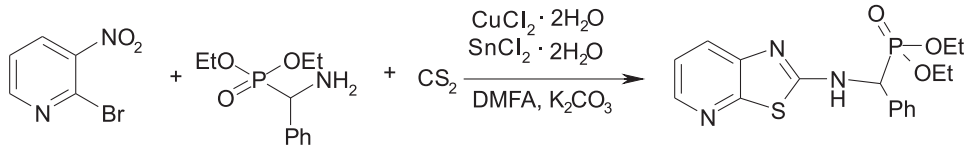
Scheme 26

thod for obtaining thiazolo[5,4-*c*]pyridine derivatives that contain the 2 α-aminophosphonate residue. The initial substances used to perform this transformation are 3-nitro-2-brompyridine, 1-aminophosphanate and CS_2. The reaction takes place in the DMFA medium in the presence of solutions of $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ and K_2CO_3. The yields of the target products are equal to 78-82% [48] (Scheme 28).

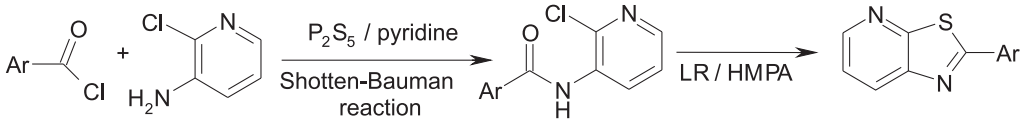
One of the methods to obtain 2-arylthiazolo[5,4-*b*] pyridines is based on using N-(2-chloro-pyridine-3-yl)arylamides [49]. These aryl amides are obtained by acylation of 2-chloro-pyridine-3-ylamine with acyl chlorides of aromatic acids according to Shotten-Bauman reaction. The compounds are subjected to thionation with phosphorus pentasulfide in the pyridine medium or Lawesson's reagent (LR) in the medium of



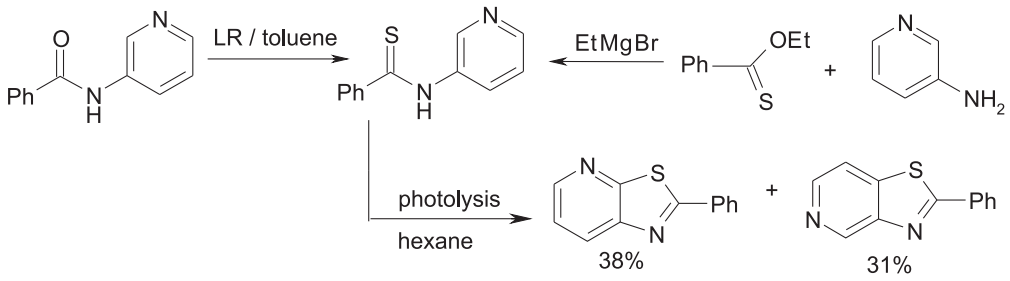
Scheme 27



Scheme 28



Scheme 29



Scheme 30

hexamethylphosphoramide (HMPA) to form 2-arylthiazolo[5,4-*b*]pyridine (Scheme 29).

The authors underline that the yields of the target products are considerably higher when Lawesson's reagent is applied. Obtaining of the mixture of 2-aryl thiazolo[5,4-*b*]pyridines and 2-aryl thiazolo [4,5-*c*]pyridines by means of photolysis of N-pyridine-3-yl-thioarylamides in the hexane medium is also suggested in the same work. It has been found that the target thioarylamides that perform the function of the initial substances in this reaction may be obtained both by N-pyridine-3-ylaryl amides thionation with the yield of 9% and by interaction of pyridine-3-yl-amine with thiobenzoate acid *ortho*-ethyl ether in the presence of Grignard reagent with the yield of 68% (Scheme 30).

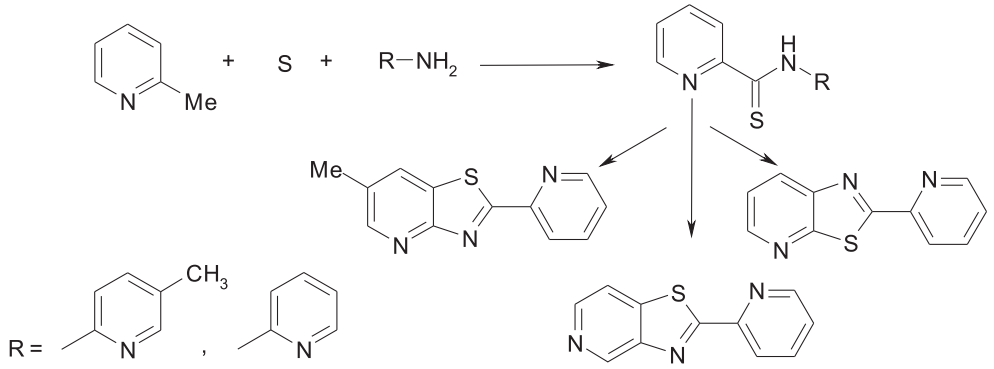
Thiazolopyridines were obtained by thioamide pyridine oxidation using hexacianoferrate potassium in the alkaline medium [50] (Scheme 31).

The new approach to formation of thiazolo[4,5-*b*]pyridines or thiazolo[5,4-*b*]pyridines systems is based on the method of oxidative cyclization of monothioxamides. In this method α-chloracetamides and amino derivatives of pyridine (pyridine-2,6-diamine and pyridine-3-ylamine) are the initial substances, which form monothioxamides at the first stage, and they are oxidized in the NaOH solution under the action of $K_3[Fe(CN)_6]$ at 50°C with cyclization to the target 5-aminothiazolo[4,5-*b*]pyridines-2-carboxamides or thiazolo[5,4-*b*]pyridines-2-carboxamides [51-54] at the next stage (Scheme 32).

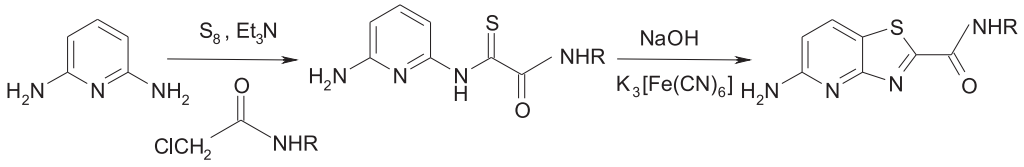
Proceeding from the derivatives of 2-chloropyridine-3-ylamine and (2,4-dihydroxyphenyl)-[(2.4-dihydroxyphenyl)-thioxo-methano-sulfinyl]methanethione using one pot synthesis, (1,3-thiazolo[5,4-*b*] pyridine-2-yl)benzendiols [55] (Scheme 33).

Synthesis of thiazolo[4,5-*b*]pyridines using solid-phase carriers. There are also instances of obtaining 1,3-thiazolo[4,5-*b*]pyridine derivatives based on using solid-phase carriers [56]. This method is carried out based on Torp Ziegler cyclization at the first stage, and at the next stage – on Friedlander's reaction in the conditions of micro-wave activation with further electrophilic displacement by amines. The given transformations provide obtaining of 2,5, 6,7-tetrasubstituted derivatives of thiazolo[4,5-*b*]pyridine (Schemes 34, 35).

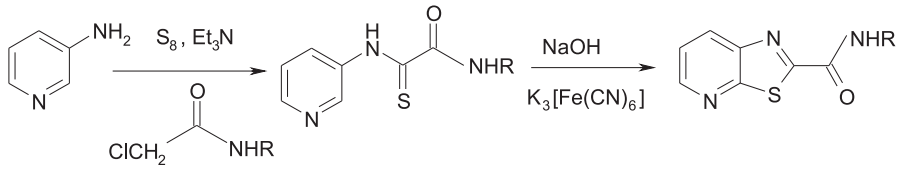
Synthesis of thiazolo[4,5-*b*]pyridines using "domino" reaction methods. The new combinatorial method of obtaining the substituted thiazolo[4,5-*b*]pyridines has been developed by the Institute of Organic Chemistry named after M.D.Zelinsky. It is based on the use of "domino" reactions of the following type: S_N2 → Torp Ziegler reaction → Guareschi-*Thorpe* reaction [57, 58]. The initial substances in this method are cyanoacetamides heterocumulenes (isothiocyana-



Scheme 31

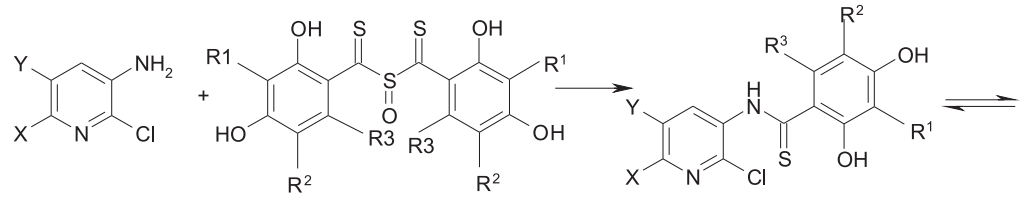


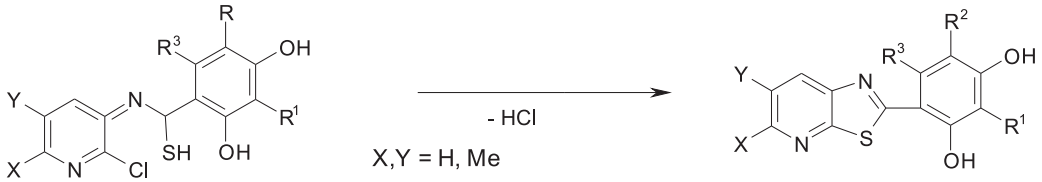
R = C_6H_5, 4-BrC_6H_4, 4-ClC_6H_4, 4-FC_6H_4, 4-MeC_6H_4, 4-$MeOC_6H_4$, 2-FC_6H_4



R= C_6H_5, 4-FC_6H_4, 2,6-$(Me)_2C_6H_3$, 4-BrC_6H_4

Scheme 32

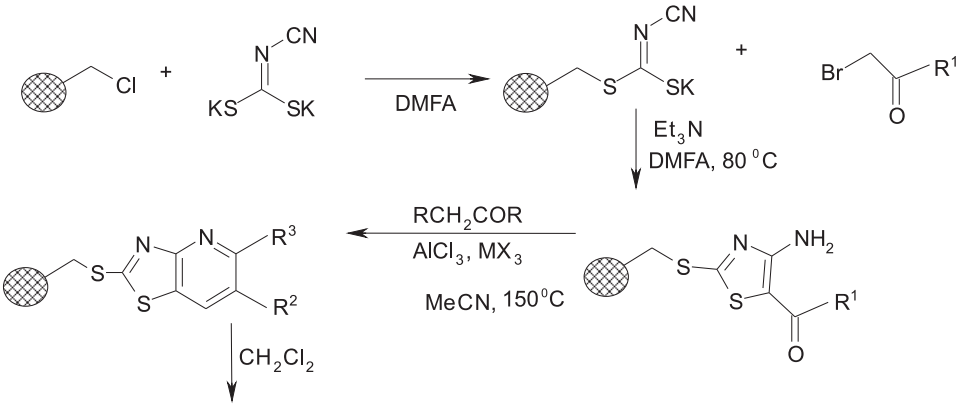


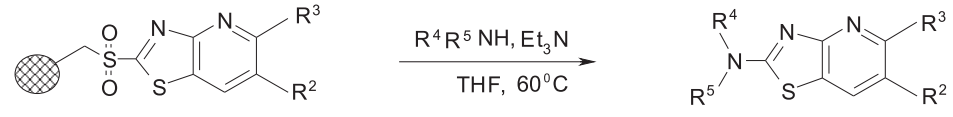


X,Y = H, Me

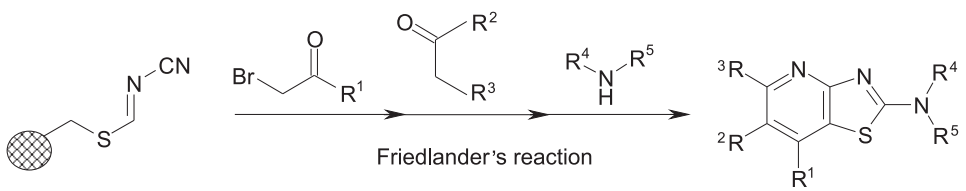
R^1, R^2, R^3 = H, Me, Et, OH, Cl

Scheme 33

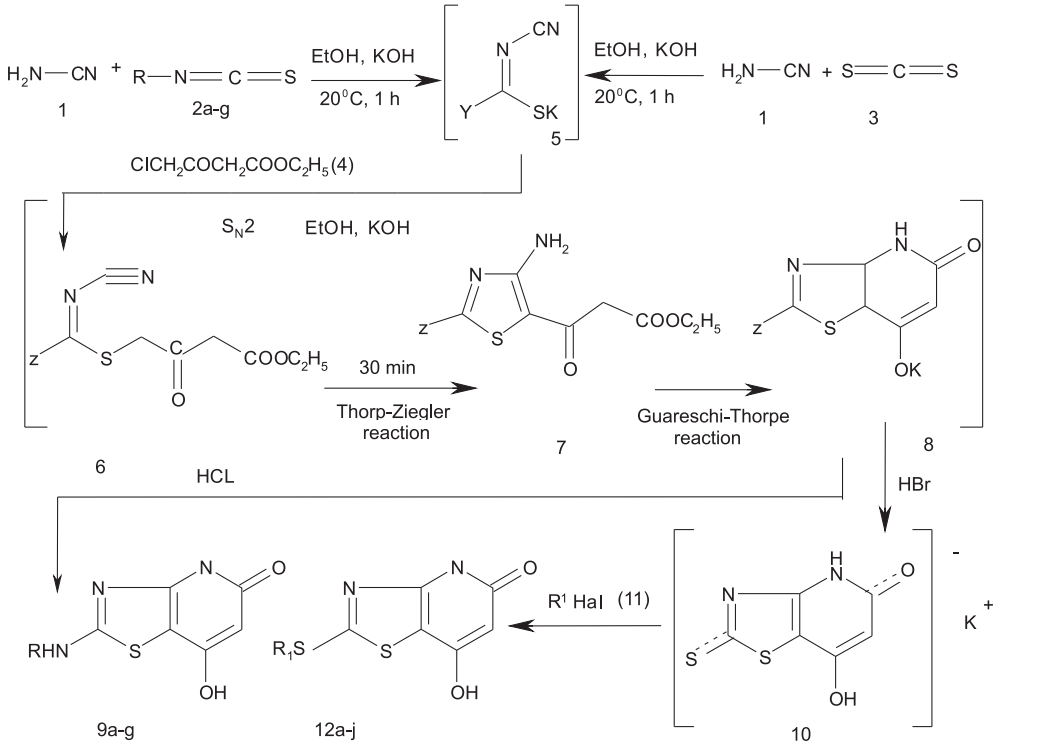




Scheme 34

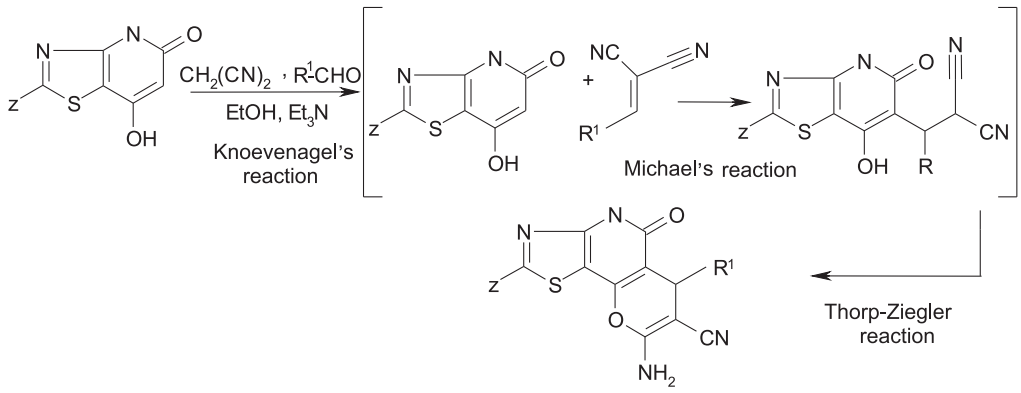


Scheme 35



Z=NHR, SK=2, 9: R=CH_3 (a); CH_3CH_2 (b); $CH_2CH\text{-}CH_2$ (c); C_6H_5 (d); 4-OCH_3-C_6H_4 (e); 3-Cl-C_6H_4 (f); 3-F-C_6H_4 (g). 11, 12: R1=CH_3 (a); CH_3CH_2 (b); CH_2-3-C_5H_4N (c); CH_2-2,6-Cl_2-C_6H_3 (d); CH_2-3,4-F_2-C_6H_3 (e); CH_2-3-CF_3-C_6H_4 (f); CH_2-CO-3,4-(OCH3)2-C_6H_3 (g); CH_2-CONH-Ad1 (h); CH_2-CONH-3,4-F_2-C_6H_3 (i); CH_2-CONH-2-CF_3-C_6H_4 (j).

Scheme 36



Scheme 37

tes, sulfur carbonate) and ethyl-4-chloracetylacetate, which are able to form the target thiazolo[4,5-*b*] pyridines due to "domino" reactions (Scheme 36).

The products obtained are used with aldehydes and malononitrile in another "domino"reaction of the type: Knoevenagel's reaction → Michael's reaction → Torp Ziegler reaction for the synthesis of the substituted 4,6-dihydro-5*H*-pyrano[2,3-*d*]thiazolo[4,5-*b*] pyridines (Scheme 37).

Pharmacological effects. The combination of combinatory chemistry and highly effective pharmacological screening has made possible identification of a large group of cell biotargets. The abovementioned fact promoted to more effective study and understanding of the details of the mechanism of action of pharmacological agents, as well as the considerable expansion of chemical compounds as potential drugs. The application of the aforementioned strategy has become a key factor in the rapid development of the pharmacological potential of the condensed thiazole and thiazolidone derivatives and allowed to discover new pharmacological effects of the given compounds, as well as further develop the peculiarities of the mechanisms of action revealed earlier due to the detailed elaboration at the "ligand – receptor" level.

Thus, thiazolopyridine derivatives demonstrate the analgesic, anti-inflammatory, antimicrobial and antifungal [8, 59-64]) activities. Due to the inhibitory action on integrally linked kinase the specified class of compounds can eliminate the hyperprolifera-

tive disorders in the living organisms [65-67]. The antidiabetic [68], antibacterial [69], antituberculosis [70], anti-inflammatory [71, 72] effects were determined. It is known that thiazolopyridine derivatives show a positive effect in the treatment of the sex dysfunction [73]. Among this type of compounds there are substances that act as agonists of H3-histamine receptors [48], antagonists of metabotropic glutamate receptors 5 (mGLuR5) [74] with a high inhibitory activity in relation to receptors of the epidermal growth factor [75] and a number of other enzymes [76, 77]. Gu L. and co-authors have found that thiazolopyridine derivatives, which contain the α-amino phosphonate residue in position 2 of the basic heterocycle, possess a considerable anticancer effect [49]. The antioxidant activity is also typical for the aforementioned class of compounds.

Conclusions

The analysis and systematization of the literature references have been performed concerning the methods of synthesis and properties of thiazolopyridines. Thus, wide synthetic opportunities and their high pharmacological potential have been proven to be the indisputable reasons for the systematic research of the type of compounds described.

References

1. *Brown F. C. Chemical Reviews, 1961, Vol. 61, No.5, pp.463-521.*
2. *Singh S. P., Parmar S. S., Raman K. et. al. Chemical Reviews, 1981, Vol. 81, No.2, pp.175-203.*
3. *Zimenkovsky B. S., Lesyk R. B. 4-Thiazolidony. Chimiya, fiziologichna diya, perspektyvy (4-Thiazolidones. Chemistry, physiological action, perspectives). Vinnycya, Nova knyga, 2004, 106 p.*
4. *Lesyk R. B., Zimenkovsky B. S. Current Organic Chemistry, 2004, Vol. 8, No.16, pp.1547-1579.*
5. *Komaritsa I. D. Chemistry of Heterocyclic Compound, 1968, No.3, pp.436-437.*
6. *Komaritsa I. D. Chemistry of Heterocyclic Compound, 1989, No.11, pp.1547-1549.*
7. *Chaban T. I., Zimenkovskii B. S., Komaritsa I. D. et. al. Russ. J. Org. Chem., 2012, Vol. 48, Issue 2, pp.268-270.*
8. *Chaban T. I., Ogurtsov V. V., Chaban I. G. et al. Zhurnal organichnoi ta farmacevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry, 2012, Vol. 10, No.2(38), pp.70-76.*
9. *Chaban T. I., Panchuk R. R., Klenina O. V. et al. Biopolymers and Cell, 2012, Vol. 28, No.5, pp.389-396.*
10. *Chaban T. I., Ogurtsov V. V., Chaban I. G. et al. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 2013, Vol. 188, pp.1611-1620.*
11. *Dudinov A. A., Lichitsky B. V., Antonov I. A. et al. Russian Chemical Bulletin., 2008, No.8, pp.1707-1710.*
12. *Lichitsky B., Komogortsev A., Dudinov A. et al. The 5th Eurasian Meeting on Heterocyclic Chemistry, Book of abstracts, 2008, Kuwait, p.124.*
13. *Lichitsky B., Komogortsev A., Dudinov A. et al. The 23nd International Symposium on the Organic Chemistry of Sulfur, Abstracts, 2008, Moscow, pp.100-102.*
14. *Lichitsky B., Komogortsev A., Dudinov A. et al. The III Youth conference Institute of organic Chemistry Russian Academy of Sciences, 2009, Moscow, U4-15-17.*
15. *Комогорцев А. Н. Трехкомпонентная конденсация гетероциклических аминов с карбонильными соединениями и кислотой Мельдрума: автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. хим. наук: спец. 02.00.03 «Органическая химия» / А. Н. Комогорцев. – Москва, 2009. – 26 с.*
16. *Hayakawa I., Tanaka Y. Heterocycles, 1984, Vol. 22, No.8, pp. 1697-1700.*
17. *Schäfer H., Hartmann H., Gewald K. J. Prakt. Chem., 1974, Vol. 316, No.1, pp.19-25.*
18. *Leysen D. C., Haemers A., Bollaert W. J. Het. Chem., 1984, Vol. 21, No.2, pp.401-406.*
19. *Shafiee A., Ghazar H. J. Het. Chem., 1986, Vol. 23, No.4, pp.1171-1173.*
20. *El-Sayed I. El-Desoky, Aboul- Fetouh S., Metwally M. A. J. Chem. Tech. & Biotechnol., 1996, Vol. 67, No.2, pp.153-156.*
21. *Flaig R., Hartmann H. Monatshefte für Chemie, 1997, Vol. 128, No.10, pp.1051-1060.*
22. *Yarovenko V. N., Nikitin A. S., Zavarzyn I. V. et al. Zhurnal organicheskoi khimii, 2007, Vol. 43, No.9, pp.1368-1374.*
23. *Никитина А. С. Синтез гетероциклических соединений на основе тиогидразидов оксаминовых кислот: автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. хим. наук: – спец. 02.00.03 «Органическая химия» / А. С. Никитина. – Москва, 2009. – 18 с.*
24. *Renskyy M. A, Zyabrev V. S., Drach B. S. Zhurnal obshchey khimii, 2002, Vol. 72, No.11, pp.1931-1932.*
25. *Ренський М. О. Нові перетворення 1,2,4-тіадіазол-5(2н)-імінів та їх солей у похідні інших азотистих гетероциклів: автореф. дис. на здобуття вченого ступеня канд. хім. наук: спец. 02.00.03 «Органічна хімія» / М. О. Ренський. – К., 2005. – 19 с.*
26. *Krayushkin M. M., Yarovenko V. N., Sedishev I. P. et al. Mendeleev Commun., 2005, Vol. 15, No.4, pp.151-152.*
27. *Krayushkin M. M., Sedishev I. P., Yarovenko V. N. et al. Russ. J. Org. Chem., 2008, Vol. 44, No.3, pp.407-411.*
28. *Iaroshenko V. O., Volochnyuk D. M., Kryvokhyzha N. V. et al. Synthesis, 2008, Vol. 15, pp.2337-2346.*
29. *Artyomov V. A., Ivanov V. L., Shestopalov A. M. et al. Tetrahedron, 1997, Vol. 53, No.39, pp.13351-13360.*
30. *Иванов В. Л. Каскадные реакции в синтезе конденсированных пиридинов и пиримидинов: автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. хим. наук: спец. 02.00.03 «Органическая химия» / В. Л. Иванов. – М., 1997. – 20 с.*
31. *Pat. DE 233010. – Publ. 03.01.1974. Chem. Abstr., 1974, Vol. 80, 95916 p.*
32. *Suzuki N., Dohmori R. Chem. Pharm. Bull., 1979, Vol. 27, No.2, pp. 410-418.*
33. *Couture A., Grandclaudon P., Huguerre E. J. Het. Chem., 1987, Vol. 24, No.6, pp.1765-1770.*
34. *Couture A., Huguerre E., Grandclaudon P. Synt. Comm., 1989, Vol. 19, No.3, pp.713-719.*
35. *Zhu L., Zhang M., Dai M. J. Het. Chem., 2005, Vol. 42, No.4, pp.727-730.*
36. *Kulkarni D. G., Lokhande S. R. Ind. J. Pharm., 1981, Vol. 43, pp.37-39.*
37. *Altland H. W., Molander G. A. J. Het. Chem., 1977, Vol. 14, No.1, pp.129-134.*
38. *Altland H. W. J. Org. Chem., 1976, Vol. 41, No.21, pp.3395-3398.*
39. *Pat. US 2005065151; Publ. 24.03.2005, http://www.espacenet.com.*
40. *Tsuruoka A., Kaku Y., Kakinuma H. et al. Chem. Pharm. Bull., 1998, Vol. 46, No.4, pp.623-630.*
41. *Smith K., Lindsay C. M., Morris J. K. Chem. Ind (London), 1988, pp.302-303.*
42. *Ma E. Molecules, 2003, Vol. 8, pp.678-686.*
43. *El-Hiti G. A. Monatshefte fuer Chemie, 2003, Vol. 134, No.6, pp.837-841.*
44. *Smith K., Anderson D., Matthews I. Sulfur Letters, 1995, Vol. 18, No.2, pp.79-95.*

45. *Fridman S. G. Zhurnal obshchey khimii, 1956, Vol. 26, pp.613-617.*
46. *Fridman S. G. Zhurnal obshchey khimii, 1956, Vol. 26, pp.864-867.*
47. *Walczyn´ski K., Zuiderveld O. P., Timmerman H. European Journal of Medicinal Chemistry, 2005, Vol. 40, No.1, pp.15-23.*
48. *Gu and C. Jin L. Org. Biomol. Chem., 2012, Vol. 10, pp.7098-7102.*
49. *Couture A., Grandclaudon P. Heterocycle, 1984, Vol. 22, No.6, pp.1383-1385.*
50. *Kramberger L., Lorencak P., Polanc S. et al. J. Het. Chem., 1975, Vol. 12, No.2, pp.337-342.*
51. *Zavarzin I. V., Krayushkin M. M., Yarovenko V. N. et al. Russian Chemical Bulletin, 2004, No.6, pp.1299-1301.*
52. *Zavarzin I. V., Smirnova N. G., Yarovenko V. N. et al. Russ. Chem. Bull., 2004, Vol. 53, No.6, pp.1353-1354.*
53. *Смирнова Н. Г. Монотиооксамиды в синтезе конденсированных гетероциклических структур: автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. хим. наук: спец. 02.00.03 «Органическая химия» / Н. Г. Смирнова. – М., 2006. – 20 с.*
54. *Заварзин И. В. Монотиооксамиды и тиогидразиды оксаминовых кислот в органическом синтезе: автореф. дисс. на соискание ученой степени докт. хим. наук: спец. 02.00.03 «Органическая химия» / И. В. Заварзин. – М., 2009. – 48 с.*
55. *Matysiak J., Karpin´ska M., Niewiadomy A. et al. Chemistry & Biodiversity, 2012, Vol. 9, No.1, pp.48-56.*
56. *Taeho Lee, Doohyun Lee, Ill Young Lee et al. J. Comb. Chem, 2010, Vol. 12, No.1, pp.95-99.*
57. *Shestopalov A. M., Rodinovskaya L. A., Shestopalov A. A. Tetrahedron, 2010, Vol. 66, No.46, pp.8945-8948.*
58. *Shestopalov A. M., Rodinovskaya L. A. Proceedings of the Fourth International Conference "Modern aspects of heterocyclic chemistry", St. Petersburg, 2010, pp.361-363.*
59. *Komaritsa I. D., Chaban I. G., German V. M. Pharmacevticheskoiy zhurnal, 1992, No.4, pp.39-43.*
60. *Al-Thebeiti Marzoog S. Il Farmaco. 2000, Vol. 55, pp.109-118.*
61. *Ulrich H. Georg Thieme Verlag: Stuttgart – New York, 2002, Vol. 11, pp.835-912.*
62. *El-Hiti G. A. Monatshefte fuer Chemie. 2003, Vol. 134, pp.837-841.*
63. *A.c. 1262931 СССР; заявл. 06.12.84 / ДСП.*
64. *A.c. 1282512 СССР; заявл. 14.06.85 / ДСП.*
65. *Pat. WO2004011460 – Publ. 05.02.2004. Chem. Abstr., 2004, Vol. 140, 163862 p.*
66. *Pat. WO 2005037845. – Publ. 28.04.2005, No.WO 2004US34397. – http://www.espacenet.com.*
67. *Pat. WO 2004099204. – Publ.18.11.2004, N.WO2004SE00694. – http://www.espacenet.com.*
68. *Pat. WO 2004011460. – Publ. 05.02.2004. Chem. Abstr., 2004, Vol. 140, 63862 p.*
69. *Pat. WO 2009147431. – Publ. 10.12.2009, No.GB2009/050609. – http://www.espacenet.com.*
70. *Chaban T., Klenina O., Drapak I. et al. Ch&ChT, 2014, Vol. 8 (3), pp.287-292.*
71. *Chaban T. I., Ogurtsov V. V., Komaritsa I. D. et al. Klinichna farmaciya, farmakoterapiya ta medychna standartyzaciya – Clinical pharmacy, pharmacotherapy and medical standardization, 2011, No.1-2, pp.208-213.*
72. *Klenina O. V., Chaban T. I., Ogurtsov V. V. et al. Zhurnal organichnoi ta farmacevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry, 2014, Vol. 12, No.1(45), pp.60-68.*
73. *Pat. WO 2003101994. – Publ. 11.12.2003. Chem. Abstr., 2004, Vol. 140, 27845 p.*
74. *Kulkarni S. S., Newman A. H. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007, Vol. 17, pp.2987-2991.*
75. *Lin R., Johnson S. G., Connolly P. J. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, Vol. 19, pp.2333-2337.*
76. *Komoriya S., Kobayashi S., Osanai K. et al. Bioorg. Med. Chem., 2006, Vol. 14, pp.1309-1330.*
77. *Singh B., Bacon E. R., Lesher G. Y. et al. J. Med. Chem., 1995, Vol. 38, pp.2546-2550.*

Надійшла до редакції 14.07.2014 р.

UDC 547.732:547.853.3:66.095.112

SYNTHESIS AND THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 1-ALKYL-5-METHYL-3-PHENYL-6-(5-PHENYL-1,3,4-OXADIAZOL-2-YL) THIENO[2,3-*d*]PYRIMIDINE-2,4(1*H*,3*H*)-DIONES

S.V.Vlasov[a], T.P.Osolodchenko[b], S.M.Kovalenko[a], V.P.Chernykh[a]

[a] National University of Pharmacy
53, Pushkinska str., Kharkiv, 61002, Ukraine. E-mail: kosn@ukrfa.kharkov.ua
[b] Institute Microbiology and Immunology named after I.I.Mechnikov NAMS of Ukraine

Key words: thiophene; pyrimidine; alkylation

An effective approach for synthesis of 5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno[2,3-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione by 1,1'-carbonyldiimidazole promoted interaction of 5-methyl-2,4-dioxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydrothieno[2,3-d]pyrimidine-6-carboxylic acid with benzohydrazide has been developed. The procedure also includes cyclization of N'-benzoyl-5-methyl-2,4-dioxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydrothieno[2,3-d]pyrimidine-6-carbohydrazide obtained by boiling in phosphorous oxychloride and further hydrolysis of the chlorine atom at position 2 of the thieno[2,3-d]pyrimidine system. Alkylation of the assembly of two heterocyclic units obtained with benzyl chlorides, chloroacetamides, and 5-(chloromethyl)-3-aryl-1,2,4-oxadiazoles has allowed obtaining of 1-alkyl-5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno[2,3-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-diones. The structures of the compounds obtained have been confirmed by the ^{1}H NMR, chromato-mass spectral and elemental microanalysis data. The results of the screening performed by the agar diffusion method ("well method") have shown the absence of the antimicrobial activity for 1-benzyl-5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl) thieno[2,3-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-diones and 2-[5-methyl-2,4-dioxo-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-3,4-dihydrothieno[2,3-d]pyrimidin-1(2H)-yl]-N-arylacetamides; but the activity for 1-{[3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl] methyl}-5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno[2,3-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-diones has been found. The compounds of this range appeared to be active against the strains of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Bacillus subtilis; the diameters of their growth inhibition zones were similar to those for the reference drugs Metronidazole and Streptomycin.

СИНТЕЗ ТА АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ 1-АЛКІЛ-5-МЕТИЛ-3-ФЕНІЛ-6-(5-ФЕНІЛ-1,3,4-ОКСАДІАЗОЛ-2-ІЛ)ТІЄНО[2,3-d]ПІРИМІДИН-2,4(1H,3H)-ДІОНІВ
С.В.Власов, Т.П.Осолодченко, С.М.Коваленко, В.П.Черних
***Ключові слова*:** *тіофен; піримідин; алкілювання*
Розроблено ефективний підхід до синтезу 5-метил-3-феніл-6-(5-феніл-1,3,4-оксадіазол-2-іл)тієно[2,3-d]піримідин-2,4(1H,3H)-діону шляхом промотованої 1,1'-карбонілдіімідазолом взаємодії 5-метил-2,4-діоксо-3-феніл-1,2,3,4-тетрагідротієно[2,3-d]піримідин-6-карбонової кислоти з бензогідразидом. Процедура також включає наступну циклізацію отриманого N'-бензоїл-5-метил-2,4-діоксо-3-феніл-1,2,3,4-тетрагідротієно[2,3-d]піримідин-6-карбогідразиду кип'ятінням у хлорокисі фосфору та подальший гідроліз атома хлору у положенні 2 тієно[2,3-d]піримідинової системи. Алкілювання отриманого дволанкового ансамблю гетероциклів бензилхлоридами, хлороацетамідами та 5-(хлорометил)-3-арил-1,2,4-оксадіазолами дозволило отримати 1-алкіл-5-метил-3-феніл-6-(5-феніл-1,3,4-оксадіазол-2-іл)тієно[2,3-d]піримідин-2,4(1H,3H)-діони. Структури отриманих сполук були підтверджені на основі даних ^{1}H ЯМР, хромато-мас спектрів та елементного аналізу. За результатами скринінгу методом дифузії в агар («метод колодязів») встановлено відсутність антимікробної активності у 1-бензил-5-метил-3-феніл-6-(5-феніл-1,3,4-оксадіазол-2-іл)тієно[2,3-d]піримідин-2,4(1H,3H)-діонів та 2-[5-метил-2,4-діоксо-3-феніл-6-(5-феніл-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-3,4-дигідротієно[2,3-d]піримідин-1(2H)-іл]-N-арилацетамідів, а також наявність антимікробної активності для 1-{[3-арил-1,2,4-оксадіазол-5-іл]метил}-5-метил-3-феніл-6-(5-феніл-1,3,4-оксадіазол-2-іл)тієно[2,3-d]піримідин-2,4(1H,3H)-діонів. Дані речовини виявили антимікробну активність до штамів Staphylococcus aureus, Escherichia coli та Bacillus subtilis із значеннями зон затримки росту, близькими до препаратів порівняння метронідазолу та стрептоміцину.

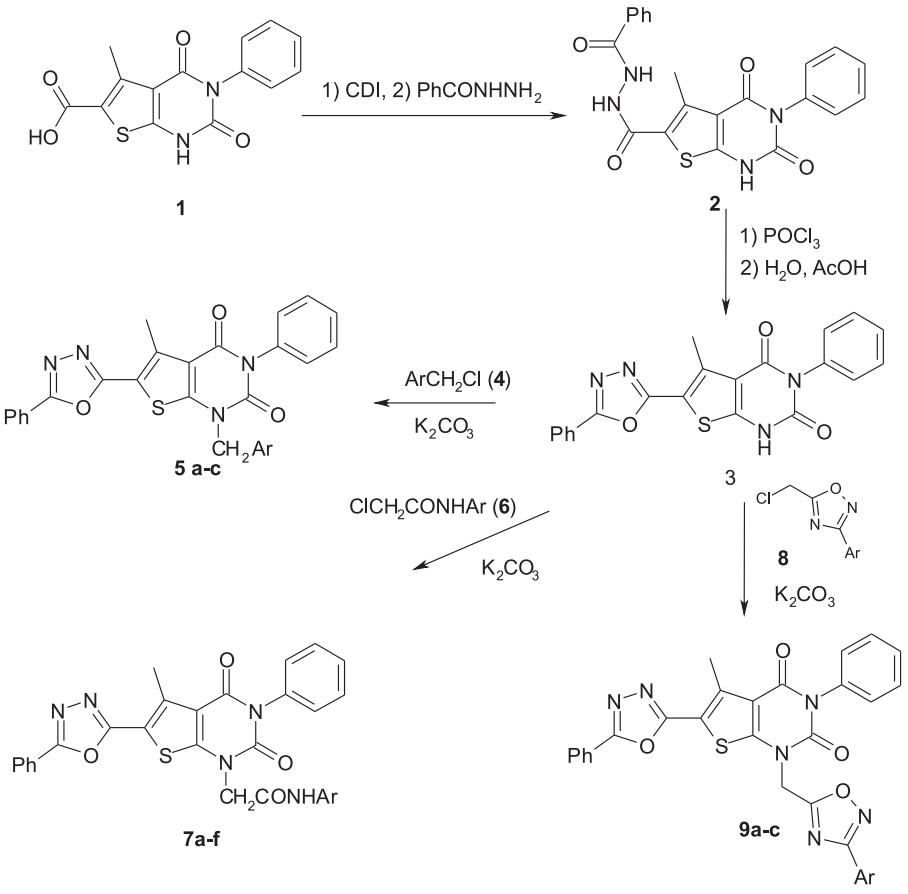
СИНТЕЗ И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ 1-АЛКИЛ-5-МЕТИЛ-3-ФЕНИЛ-6-(5-ФЕНИЛ-1,3,4-ОКСАДИАЗОЛ-2-ИЛ)ТИЕНО[2,3-d]ПИРИМИДИН-2,4(1H,3H)-ДИОНОВ
С.В.Власов, Т.П.Осолодченко, С.Н.Коваленко, В.П.Черных
***Ключевые слова*:** *тиофен; пиримидин; алкилирование*
Разработан эффективный подход к синтезу 5-метил-3-фенил-6-(5-фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-2,4(1H,3H)-диона путем промотированного 1,1'-карбонилдиимидазолом взаимодействия 5-метил-2,4-диоксо-3-фенил-1,2,3,4-тетрагидротиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоновой кислоты с бензогидразидом. Процедура также включает циклизацию полученного N'-бензоил-5-метил-2,4-диоксо-3-фенил-1,2,3,4-тетрагидротиено[2,3-d]пиримидин-6-карбогидразида кипячением в хлорокиси фосфора и дальнейший гидролиз атома хлора в положении 2 тиено[2,3-d]пиримидиновой системы. Алкилирование полученного двухзвенного ансамбля гетероциклов бензилхлоридами, хлорацетамидами и 5-(хлорметил)-3-арил-1,2,4-оксадиазолами позволило получить 1-алкил-5-метил-3-фенил-6-(5-фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-2,4(1H,3H)-дионы. Структуры полученных соединений были подтверждены на основе данных ^{1}H ЯМР, хромато-мас спектров и элементного анализа. По резуль-

татам скрининга методом диффузии в агар («метод колодцев») установлено отсутствие противомикробной активности у 1-бензил-5-метил-3-фенил-6-(5-фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-2,4(1H,3H)-дионов и 2-[5-метил-2,4-диоксо-3-фенил-6-(5-фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3,4-дигидротиено[2,3-d]пиримидин-1(2H)-ил]-N-арилацетамидов, а также наличие противомикробной активности для 1-{[3-арил-1,2,4-оксадиазол-5-ил]метил}-5-метил-3-фенил-6-(5-фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил) тиено[2,3-d]пиримидин-2,4(1H,3H)-дионов. Данные вещества проявили противомикробную активность к штаммам Staphylococcus aureus, Escherichia coli и Bacillus subtilis со значениями зон задержки роста, близкими к препаратам сравнения метронидазолу и стрептомицину.

In the last years the modification of position 6 of the thieno[2,3-*d*]pyrimidine system with 1,3,4-oxadiazole substituents has become popular as the way for obtaining of the novel biologically active compounds. The first attempt of such synthesis was cyclization of thieno[2,3-*d*]pyrimidin-6-carboxylic acids hydrazides with orthoesters [1], or by cyclization using treatment with phosphorous oxychloride of the products of similar hydrazides acylation with acyl halides [2]. The authors of the article [3] also proposed application of the *one-pot* method where the corresponding hydrazide reacts with thieno[2,3-*d*]pyrimidin-6-carboxylic acid right in the $POCl_3$ media. Recently we have reported the approach using generated *in situ* imidazolide of thieno[2,3-*d*]pyrimidin-6-carboxylic acid for the reaction with benzohydrazide suitable for preparation of the product, which after cyclization in phosphorous oxychloride allows forming the 1,3,4-oxadiazole cycle in position 6 of thieno[2,3-*d*]pyrimidine [4]. Our previous data also reported about some derivatives of thieno[2,3-*d*]pyrimidine ranges modified at position 6 with azole heterocyles as the compounds with the promising antimicrobial activity [2, 4, 5, 6].

In view of such biological activity potential of 5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl) thieno[2,3-*d]*pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-diones and in order to investigate the scope of the method previously proposed for modification of thieno[2,3-*d*]pyrimidine position 6 with 1,3,4-oxadiazole we have performed the interaction of 5-methyl-2,4-dioxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydrothieno[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxylic acid [6, 7] imidazolide with benzohydrazide.

As the result of our experiment *N*'-benzoyl-5-methyl-2,4-dioxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydrothieno [2,3-*d*]pyrimidine-6-carbohydrazide **2** was isolated; its further cyclization was performed by heating in phosphorous oxychloride (Scheme). The 2-chlorointermediate obtained was hydrolyzed to 5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno [2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione **3** by heating in the water-acetic acid medium after the continuous heating.



Scheme

Table 1

Physico-chemical properties of 1-alkyl-5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-diones **5**, **7** and **9**

Compd No.	Ar	Mol. formula M.w.	Yield %, in the alkylation step	M.p., °C	N% calc. / found
5a	C_6H_5	$C_{28}H_{20}N_4O_3S$ 492.56	87	295-297	11.37 / 11.56
5b	C_6H_4-4-CH_3	$C_{29}H_{22}N_4O_3S$ 506.59	85	290-291	11.06 / 11.13
5c	C_6H_3-3,4-diF	$C_{28}H_{18}F_2N_4O_3S$ 528.54	83	266-267	10.60 / 10.79
7a	C_6H_5	$C_{29}H_{21}N_5O_4S$ 535.59	76	>300	13.08 / 13.20
7b	C_6H_4-4-CH_3	$C_{30}H_{23}N_5O_4S$ 549.61	83	>300	12.74 / 12.79
7c	C_6H_4-4-i-Pr	$C_{32}H_{27}N_5O_4S$ 577.67	79	>300	12.12 / 12.34
7d	C_6H_3-3,4-diOMe	$C_{31}H_{25}N_5O_6S$ 595.64	68	>300	11.76 / 11.81
7e	C_6H_4-4-OEt	$C_{31}H_{25}N_5O_5S$ 579.64	85	>300	12.08 / 12.25
7f	C_6H_3-4-Me-2-Cl	$C_{30}H_{22}ClN_5O_4S$ 584.06	92	297-298	11.99 / 12.03
9a	C_6H_4-4-CH_3	$C_{31}H_{22}N_6O_4S$ 574.62	63	272-273	14.63 / 14.79
9b	C_6H_4-2-Cl	$C_{30}H_{19}ClN_6O_4S$ 595.04	68	215-217	14.12 / 14.37
9c	C_6H_4-4-Cl	$C_{30}H_{19}ClN_6O_4S$ 595.04	59	281-283	14.12 / 14.30

The further modification of product **3** was performed by its alkylation with benzyl chlorides **4**, chloroacetamides **6** and 5-(chloromethyl)-3-aryl-1,2,4-oxadiazoles **8**; using this versatile synthetic procedure 1-alkyl-5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-diones **5,7,9** were obtained. All of the final products were isolated as crystalline substances with high melting points (Tab. 1).

The structures of all of the compounds obtained were confirmed by the data of ^{1}H NMR spectroscopy and elemental analysis. In all spectra of 1-alkyl-5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl) thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-diones **5,7,9** obtained (Tab. 2) the signals of the methyl group protons at the thiophene ring are observed in the range of 2.82-2.87 ppm. The signals of the methylene group protons are located for compounds **5** at 5.21-5.26 ppm, while for the derivatives of acetamides **7** at 4.85-4.96 ppm; such location of these signals well correlate with the previously reported data [6, 8, 9] confirming the alkylation of the nitrogen atom at position 1, but not the oxygen attached at position 2. For compounds **9** of the (3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methylene range the signal of the methylene group is observed at 5.68-5.74 ppm. All of the spectra of compounds **7** contain the signal of the NH fragment in the range from 10.05 to 10.47 ppm.

The antimicrobial activity of the compounds obtained was evaluated by the agar diffusion screening method ("well method") [10, 11]. The results showed that compounds **5** and **7** tested did not reveal any antimicrobial activity, however, compounds **9** showed the antimicrobial effect against the strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*; the diameters of their growth inhibition zones were similar to those for the reference drugs Metronidazole and Streptomycin (Tab. 3).

Experimental Part

Chemical Part

The melting points (°C) were measured with a Koeffler melting point apparatus and were not corrected. ^{1}H NMR spectra were recorded on Varian Mercury (200 MHz) spectrometers in DMSO-d_6 using TMS as an internal standard (chemical shifts are in ppm). LC/MS was recorded with PE SCIEX API 150EX chromatograph equipped with the mass-spectrometer using the column C18 (100×4 мм), the cycle of analysis was 25 min.

Table 2

^{1}H NMR spectral data of 1-alkyl-5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-diones **5**, **7** and **9**

Compd No.	Chemical shift, δ, ppm.			
	NH	Thiophene CH_3 (3H, s.)	Aliphatic protons	Aromatic protons
5a	–	2.82	5.26 (2H, s, CH_2)	7.20-7.65 (13H, m, Ar-H); 8.01 (2H, m, Ar-H)
5b	–	2.82	2.27 (3H, s, CH_3); 5.21 (2H, s, CH_2)	7.11-7.67 (12H, m, Ar-H); 8.00 (2H, m, Ar-H)
5c	–	2.83	5.25 (2H, s, CH_2)	7.24-7.70 (11H, m, Ar-H); 8.02 (2H, m, Ar-H)
7a	10.47	2.85	4.89 (2H, s, CH_2)	7.08 (1H, m, Ar-H); 7.21-7.70 (12H, m, Ar-H); 8.05 (2H, m, Ar-H)
7b	10.39	2.85	2.23 (3H, s, CH_3); 4.87 (2H, s, CH_2)	7.11 (1H, d, Ar-H); 7.22-7.73 (11H, m, Ar-H); 8.02 (2H, m, Ar-H)
7c	10.41	–	1.13 (3H, s, CH_3); 1.17 (3H, s, CH_3); 2.84 (4H, m, CH_3+CH); 4.87 (2H, s, CH_2)	7.05-7.70 (12H, m, Ar-H); 8.03 (2H, m, Ar-H)
7d	10.45	2.86	3.69 (6H, s, 2 OCH_3); 4.87 (2H, s, CH_2)	6.24 (1H, m, Ar-H); 6.82 (2H, d, Ar-H); 7.26-7.69 (8H, m, Ar-H); 8.05 (2H, m, Ar-H)
7e	10.32	2.85	1.28 (3H, t, CH_3); 3.95 (2H, q, CH_2); 4.85 (2H, s, CH_2)	6.86 (2H, d, Ar-H); 7.29 (2H, d, Ar-H); 7.35-7.70 (8H, d, Ar-H); 8.04 (2H, m, Ar-H)
7f	10.05	2.85	2.24 (3H, s, CH_3); 4.96 (2H, s, CH_2)	7.13 (1H, d, Ar-H); 7.24-7.69 (8H, d, Ar-H); 8.05 (2H, m, Ar-H)
9a	–	2.85	2.35 (3H, s, CH_3); 5.68 (2H, s, CH_2)	7.22-7.68 (10H, d, Ar-H); 7.86 (2H, d, Ar-H) 8.05 (2H, m, Ar-H)
9b	–	2.85	5.74 (2H, s, CH_2)	7.25-7.73 (11H, d, Ar-H); 7.88 (1H, d, Ar-H) 8.04 (2H, m, Ar-H)
9c	–	2.86	5.70 (2H, s, CH_2)	7.31 (2H, d, Ar-H); 7.47 (3H, m, Ar-H); 7.62 (5H, m, Ar-H); 7.62 (4H, m, Ar-H)

Table 3

The antimicrobial activity of 1-{[3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl]methyl}-5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-diones **9**

	Diameter of the growth inhibition zone in mm The number of the repeated experiment n=3					
	Staphylococcus aureus ATCC 25923	*Escherichia coli* ATCC 25922	*Proteus vulgaris* ATCC 4636	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	*Bacillus subtilis* ATCC 6633	*Candida albicans* ATCC 653/885
9a	15, 16, 15	14, 14, 15	growth	growth	17, 16, 18	growth
9b	16, 15, 14	14, 15, 14	growth	growth	17, 17, 17	growth
9c	15, 15, 15	15, 14, 14	growth	growth	17, 17, 17	growth
Metr.**	14, 15, 14	14, 13, 14	growth	growth	16, 15, 16	14, 14, 14
Strept.**	15, 16, 15	15, 16, 17	growth	growth	17, 16, 17	growth

**Metr. – Metronidazole, DMSO solution, the concentration of 30 μg/ml; **Strept. – Streptomycin, H_2O solution, the concentration of 30 μg/ml.

The starting **5-methyl-2,4-dioxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydrothieno[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxylic acid 1** was obtained using the previously reported method [6].

5-Methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (3).

To the mixture of 5.0 g (0.0165 Mole) of acid **1** add 2.75 g (0.017 Mole) of 1,1'-carbonyldiimidazole and heat in 50 ml of anhydrous DMF for 25 minutes at 80°C. Then to the clear solution formed add 2.25 g (0.0165 Mole) of benzohydrazide, heat the reaction (130°C) and stir for 3-4 hours. After that quench the cool reaction mixture with water (50 ml) and filter the precipitate formed, washed with a plenty of 2-propanol-water mixture (1:1). ^{1}H NMR spectrum: 2.66 (3H, s), 7.27 (2H, d), 7.38-7.63 (6H, m), 7.90 (2H, m) 10.14 (1H, br.s), 10.53 (1H, br.s).

Suspend the dried compound **2** (6 g) in 45 ml of $POCl_3$, boil the mixture, stir till dissolution of the precipitate and then stir additionally for 5 hours. After that pour the reaction onto the crashed ice and filter the precipitate of chloroderivative. Suspend the filtered pad of chloroderivative in 70% acetic acid and boil with stirring for 12-15 hours. Next quench the reaction with water to the volume of about 250 ml, filter the precipitate formed and wash with a plenty of cold water.

M.p. >300°C.

Yield – 63%.

^{1}H NMR: 2.79 (3H, s), 7.30 (2H, d), 7.39-7.67 (6H, m), 8.03 (2H, m), 12.64 (1H ,br.s).

LC/MS: m/z (M^+) 402.

Found, %: N 14.15. $C_{21}H_{14}N_4O_3S$. Calculated, %: N 13.92. M. 402.43.

General method for synthesis of 1-alkyl-5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl) thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-diones 5, 7 and 9.

To 0.15 g (0.372 mmole) 5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione **3** in 3 ml of dimethylformamide add the corresponding alkylating agent (0.372 mmole) and 0.053 g (0.372 Mole) of K_2CO_3. Stir the mixture at 70-100°C for 8-10 hours. Then dilute the cool reaction mixture with water, filter the precipitate formed and crystallized from the suitable lower alcohol.

The study of the antimicrobial activity

According to the WHO recommendations [10, 11] the following test-strains were used: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC653/885. The bacterial concentration was 10^7 CFU/ml (determined by McFarland standard). Overnight cultures kept for 18-24 h at 36°C±1°C were used. The bacterial suspension was inoculated onto the entire surface of a Mueller-Hinton agar (Dagestan Scientific Research Institute of Nutrient Media). The compounds were introduced to the wells in the form of DMSO solution in the concentrations of 100 μg/ml; the open wells were filled with 0.3 ml of the solution.

Conclusions

An effective approach for synthesis of 5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno [2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione based on the interaction of 1,1'-carbonyldiimidazole promoted the interaction of 5-methyl-2,4-dioxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydrothieno[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxylic acid with benzohydrazide has been proposed. The procedure also includes cylcization of *N*'-benzoyl-5-methyl-2,4-dioxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydrothieno [2,3-*d*]pyrimidine-6-carbohydrazide by boiling in phosphorous oxychloride with subsequent hydrolysis of the chlorine atom of the intermediate formed. Alkylation of the heterocyclic system obtained with benzyl chlorides, chloroacetamides, and 5-(chloromethyl)-3-aryl-1,2,4-oxadiazoles resulted in the series of 1-alkyl-5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-diones. The results of the antimicrobial activity screening have shown that 1-{[3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl] methyl}-5-methyl-3-phenyl-6-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-diones are antimicrobial agents.

References

1. *Пат. US 20070208040 (2007). Заявл.: 02.03.2007. Опубл.: 06.09.2007. [Электронный ресурс] Режим доступа http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=2007208040A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20070906&DB=EPODOC&locale=en_EP.*
2. *Власов С. В., Заремба О. В., Коваленко С. М., Федосов А. І., Черних В. П. ЖОрФХ, 2011, Т. 9, №4 (36), С.24-30.*
3. *Kotaiah Y., Harikrishna N., Nagaraju K., Venkata Rao C. Eur. J. Med.Chem., 2012, Vol. 58, pp.340-345.*
4. *Vlasov S. V., Kovalenko S. M., Chernykh V. P., Krolenko K. Yu. J. Chem. Pharm. Res., 2014, Vol. 6, No.6, pp.22-27.*
5. *Власов С. В., Коваленко С. М., Черних В. П. ЖОрФХ, 2013, Т. 11, №2 (42), С.41-46.*
6. *Власов С. В., Коваленко С. М., Федосов А. І., Черних В. П. // ЖОрФХ, 2011, Т. 9, №3(35), С.51-55.*
7. *Ткаченко О. В., Власов С. В., Свєчнікова О. М., Журавель А. В. Управління, економіка та забезпечення якості в фармації, 2013, №3(29), С.23-28.*
8. *Sasaki S., Cho N., Nara Y. et al. J. Med. Chem., 2003, Vol. 46, No.1, pp.113-124.*
9. *Ogawva K., Yamawaki, Matsusita Y.I. et al. Eur. J. Med. Chem., 1993, Vol. 28, No.10, pp.769-781.*
10. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Document M100-S22, 2012, Vol. 32, No.3, CLSI, Wayne, PA, January.*
11. *American Society for Microbiology, Coyle M. B. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology: Washington, 2005, p.236.*

Надійшла до редакції 01.10.2014 р.

UDC 547.87:547.462`582

PECULIARITES OF INTERACTION BETWEEN 3-(2-AMINOPHENYL)-6-R-1,2,4-TRIAZIN-5(2*H*)-ONES AND CYCLIC ANHYDRIDES OF NON-SYMMETRIC DICARBOXYLIC ACIDS

O.Yu.Voskoboynik[1], D.Yu.Skorina[1], S.V.Shishkina[2], O.V.Shishkin[2], S.I.Kovalenko[1], V.V.Ivchuk[3]

[1] Zaporizhia State Medical University, Zaporizhia
26, Mayakovsky ave., 69035, Zaporizhia, Ukraine. E-mail: kovalenkosergiy@gmail.com
[2] State Scientific Institution "Institute for Single Crystals" of the National Academy of Sciences of Ukraine
[3] Kryvui Rih Institute of Metallurgy of Kryvui Rih National University

Key words: anhydrides of non-symmetric dicarboxylic acids; cyclisation; X-ray experiment

The peculiarities of the reaction between 3-(2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2H)-ones and cyclic anhydrides of non-symmetric (2-methylsuccinic, 2-phenylsuccinic and camphoric) acids have been described in the present article. The influence of electronic and steric effects of substituents in the anhydride molecule on cyclisation processes has been discussed. The results have shown that the interaction of 3-(2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2H)-ones mentioned above with 2-methylsuccinic and 2-phenylsuccinic acid anhydrides proceeded non-selectively and yielded the mixtures of 2-R_1-3-(2-oxo-3-R-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-6-yl)propanoic acids and 1-(2-(5-oxo-6-R-2,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl)phenyl)-3-R_1-pyrrolidine-2,5-diones. It has been found that low regioselectivity of the acylation process may be explained by insignificant electronic effects of substituents (of the methyl and phenyl fragment) in position 2 of the anhydride molecule on the electrophilic reaction centre. It has been also determined that the reaction between 3-(2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2H)-ones and camphoric anhydride proceeds regioselectively and yielded 1,2,2-trimethyl-3-(3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)cyclopentan-1-carboxylic acids. Regioselectivity of the interaction mentioned above may be explained by the steric effect of the methyl group. Identity of compounds has been proven by LC-MS, the structure has been determined via a set of characteristic signals in ^{1}H NMR, ^{13}C NMR spectra and position of cross peaks in the correlation HSQC-experiment. Mass spectra of the compounds synthesized have been also studied, the principal directions of the molecule fragmentation have been described. The structure of 1,2,2-trimethyl-3-(3-methyl-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)cyclopentane-1-carboxylic acid has been proven by X-ray analysis.

ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ 3-(2-АМІНОФЕНІЛ)-6-R-1,2,4-ТРИАЗИН-5(2*H*)-ОНІВ ТА ЦИКЛІЧНИХ АНГІДРИДІВ НЕСИМЕТРИЧНИХ ДИКАРБОНОВИХ КИСЛОТ

О.Ю.Воскобойнік, Д.Ю.Скорина, С.В.Шишкіна, О.В.Шишкін, С.І.Коваленко, В.В.Івчук

Ключові слова: *ангідриди несиметричних дикарбонових кислот; циклізація; рентгеноструктурне дослідження*

Описані особливості реакції між 3-(2-амінофеніл)-6-R-1,2,4-триазин-5(2H)-онами з ангідридами несиметричних дикарбонових кислот (2-метилбурштинової, 2-фенілбурштинової та камфорної) кислот. Обговорено вплив електронних та стеричних ефектів замісника у молекулі ангідриду на процеси циклізації. Результати показали, що взаємодія наведених вище 3-(2-амінофеніл)-6-R-1,2,4-триазин-5(2H)-онів з ангідридами 2-метилбурштинової та 2-фенілбурштинової кислот перебігала нерегіоселективно з утворенням суміші 2-R_1-3-(2-оксо-3-R-2H-[1,2,4]триазино[2,3-c]хіназолін-6-іл)пропанових кислот та 1-(2-(5-оксо-6-R-2,5-дигідро-1,2,4триазин-3-іл)феніл)-3-R_1-піролідин-2,5-діонів. Показано, що низька регіоселективність процесу ацилювання може бути пояснена незначними електронними ефектами замісників (метального та фенільного фрагменту) у положенні 2 молекули ангідриду на електрофільний реакційний центр. Також встановлено, що реакція між 3-(2-амінофеніл)-6-R-1,2,4-триазин-5(2H)-онами та ангідридом камфорної кислоти перебігає регіоселективно та приводить до утворення 1,2,2-триметил-3-(3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-c]хіназолін-6-іл)циклопентан-1-карбонових кислот. Селективність зазначеної вище реакції може бути пояснена стеричними ефектами метальної групи. Індивідуальність сполук підтверджена методом LC-MS, структуру встановлено за положенням характеристичних сигналів у ^{1}H ЯМР та ^{13}C ЯМР-спектрах та за положенням крос-піків у кореляційному HSQC-експерименті. Також були досліджені мас-спектри синтезованих сполук та описані основні напрямки фрагментації молекулярних іонів. Структуру 1,2,2-триметил-3-(3-метил-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-c]хіназолін-6-іл) циклопентан-1-карбонової кислоти було доведено за допомогою рентгеноструктурного дослідження.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ 3-(2-АМИНОФЕНИЛ)-6-R-1,2,4-ТРИАЗИН-5(2*H*)-ОНОВ И ЦИКЛИЧЕСКИХ АНГИДРИДОВ НЕСИММЕТРИЧЕСКИХ ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

А.Ю.Воскобойник, Д.Ю.Скорина, С.В.Шишкина, О.В.Шишкин, С.И.Коваленко, В.В.Ивчук

Ключевые слова: *ангидриды несимметрических дикарбоновых кислот; циклизация; рентгеноструктурные исследования*

Описаны особенности реакции между 3-(2-аминофенил)-6-R-1,2,4-триазин-5(2H)-онами и ангидридами несимметричных дикарбоновых кислот (2-метилянтарной, 2-фенилянтарной и камфорной) кислот.

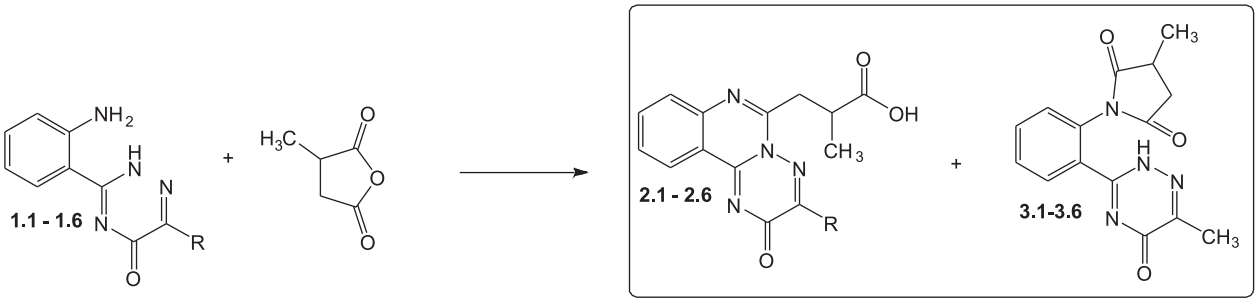
Проведено обсуждение влияния электронных и стерических эффектов заместителей на процессы циклизации. Результаты показали, что взаимодействие приведенных выше 3-(2-аминофенил)-6-R-1,2,4-триазин-5(2H)-онов с ангидридами 2-метилянтарной и 2-фенилянтарной кислот протекало не региоселективно с образованием смесей 2-R_1-3-(2-оксо-3-R-2H-[1,2,4]триазино[2,3-c]хиназолин-6-ил)пропановых кислот и 1-(2-(5-оксо-6-R-2,5-дигидро-1,2,4триазин-3-ил)фенил)-3-R_1-пиролидин-2,5-дионов. Показано, что низкая региоселективность процесса ацилирования может быть объяснена незначительными электронными эффектами заместителей (метильного и фенильного фрагмента) в положении 2 молекулы ангидрида на электрофильный реакционный центр. Также установлено, что реакция между 3-(2-аминофенил)-6-R-1,2,4-триазин-5(2H)-онами и ангидридом камфорной кислоты протекает региоселективно и приводит к образованию 1,2,2-триметил-3-(3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-c]хиназолин-6-ил)циклопентан-1-карбоновых кислот. Селективность реакции в данном случае может быть объяснена стерическим эффектом метильной группы. Индивидуальность соединений подтверждена методами LC-MS, структуру установлено по положению характеристических сигналов в ^{1}H ЯМР и ^{13}C ЯМР-спектрах и по положению кросс-пиков в корреляционном HSQC-эксперименте. Также были исследованы масс-спектры синтезированных соединений и описаны основные направления фрагментации молекулярных ионов. Структуру 1,2,2-триметил-3-(3-метил-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-c]хиназолин-6-ил)циклопентан-1-карбоновой кислоты было доказано с помощью рентгеноструктурного анализа.

To study chemical transformations of heterocyclic systems is a quite relevant problem in view of its importance in elaboration of new approaches for synthesis of novel compounds aimed at searching the potent bioactive agents. Studies devoted to creation of "scaffolds" – compounds, which may be used as the basis for synthesis of numerous combinatorial libraries, are of special practical importance. In our previous work [1] we dealt with substituted 3-(2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2*H*)-ones as 1,5-NCCCN binucleophilic compounds, which may be used as precursors for synthesis of various derivatives of 3-R-2*H*-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-2-ones with expressed biological activities [2, 3, 4, 5]. In our another publication we described the interaction of (2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2*H*)-ones with succinic and glutaric anhydride; it led to formation of the corresponding 3-(3-R-2-oxo-2*H*-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)alkylcarboxilyc acids [6].

The study of the biological action of the compounds mentioned above and their salts has shown that they reveal a high actoprotective and cerebroprotective activities, and may be characterized as promising objects of research aimed at creating new medicines. Taking into consideration the abovementioned fact we decided to extend the potential of the reaction between 3-(2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2*H*)-ones and cyclic anhydrides of dicarboxilic acids as the method for preparation of carboxyl-containing derivatives of [1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline as possible bioactive compounds. Anhydrides of 2-methylsuccinic, 2-phenylsuccinic and camphoric acids have been used as the research objects. It is important to mention that structural features of the last described, in particular electronic and steric effects of substituents, may cause the ambiguous course of the reaction.

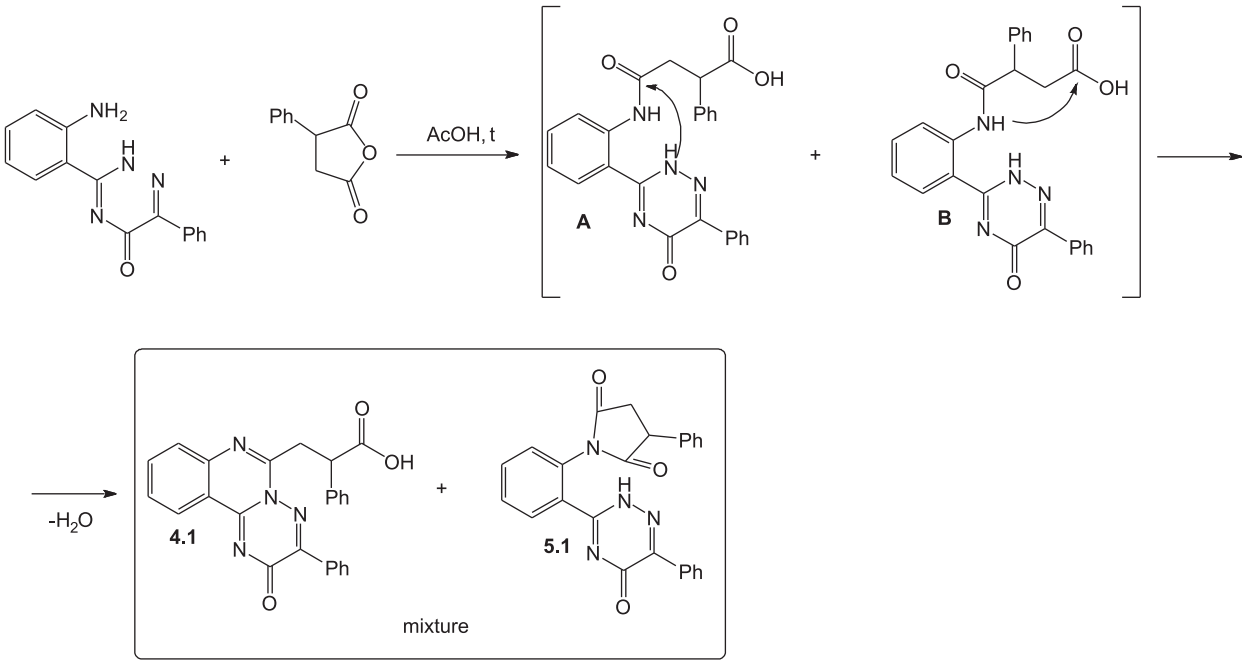
Results and Discussion

As initial compounds we used **1.1-1.6**, reactions were carried out in conditions similar to the described earlier [6], namely by boiling of the starting substances in acetic acid for 6 hours. The results obtained were quite unexpected, so, according to LC-MS data the interaction between 3-(2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2*H*)-ones **1.1-1.6** and 2-methylsuccinic anhydride occurred ambiguously and led to the formation of the mixture of 2-methyl-3-(2-oxo-3-R-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-6-yl)propanoic acid as a major product and 3-methyl-1-(2-(6-R-5-oxo-2,5-dihydro-1,2,4-triazino-3-yl)phenyl)pyrrolidin-2,5-diones (**3.1-3.6**) as the minor one (Scheme 1). A low regioselectivity of the acylation process may be explained by – an insignificant inductive effect of the methyl group on the electrophilic reaction centre. Target compounds **2.1-2.6** were isolated by crystallization from methanol, and to confirm the structure of compound **3.1** it was isolated from the reaction mixture.



1.1, 2.1, 3.1 R=Me; **1.2, 2.2, 3.2** R=Ph; **1.3, 2.3, 3.3** R= 4-CH_3Ph; **1.4, 2.4, 3.4** R=4-C_2H_5Ph; **1.5, 2.5, 3.5** R=4-$(CH_3)_2$CHPh; **1.6, 2.6, 3.6** R=4-C_2H_5OPh

Scheme 1. Interaction of 3-(2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2*H*)-ones with 2-methylsuccinic anhydride.



Scheme 2. Interaction of 3-(2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2*H*)-ones with 2-phenylsuccinic anhydride.

Identity of compounds **2.1-2.6** was proven by LC-MS, the structure was determined via a set of characteristic signals in ^{1}H NMR, ^{13}C NMR spectra and position of cross peaks in the correlation HSQC-experiment. In ^{1}H NMR-spectra of the compounds mentioned the signals of the carboxylic group proton at 12.10-12.36 ppm are characteristic. Location of the ABCD-system of the benzene fragment of the quinazoline system in a comparatively low field additionally confirms formation of the electron deficient tricyclic system. Mutual location of signals of the carboxyalkyl fragment, in particular signals of stereotopic protons of the methylene fragment in the aliphatic part at 3.74-3.79 and 3.10-3.40 ppm, allows to suggest that the methyl group is located at α-position relative to the carboxylic group. Location of other signals in ^{1}H NMR and ^{13}C NMR-spectra, as well as location of cross peaks in correlation of the HSQC-experiment also confirm the structures proposed.

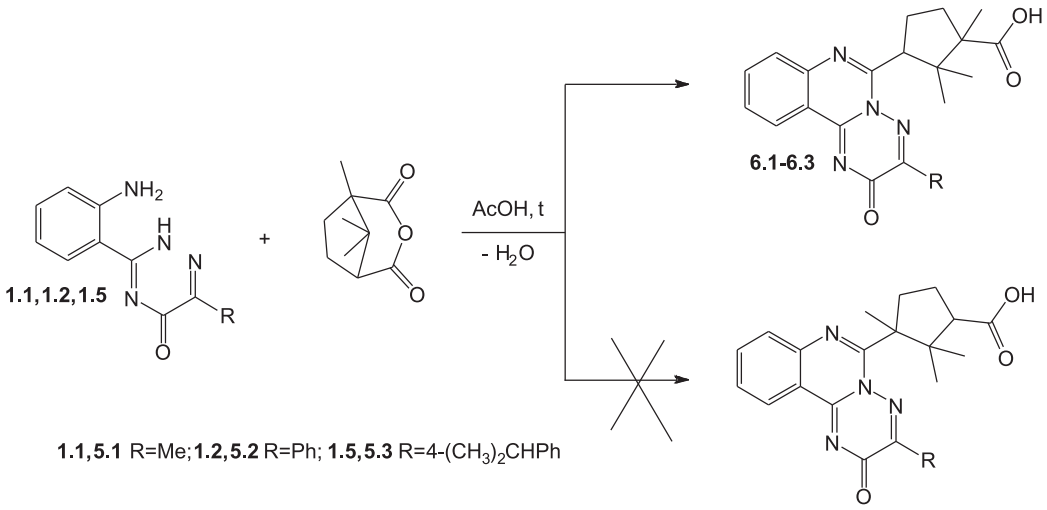
^{1}H NMR-spectra of compounds **3.1** substantially differ from the spectra of compounds **2.1-2.6**. Thus, in the spectra of compound **3.1** instead of the carboxylic group signal the abnormally deshielded NH-proton signal at 13.19 ppm was detected. The protons of the benzene cycle of the quinazoline fragment were located in quite higher field comparing to the spectra of compounds **2.1-2.6** indicating the absence of the electron deficient triazinoquinazoline system.

The unexpected results were also obtained while studying the interaction of 3-(2-aminophenyl)-6-phenyl-1,2,4-triazine-5(2*H*)-ones with 2-phenylsuccinic anhydride. According to LC-MS data boiling of the compounds mentioned above in acetic acid yielded the mixture of two compounds with the equivalent value of m/z corresponding to the molecular weight of proper 3-(2-oxo-3-phenyl-2*H*-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)-2-phenyl-propanoic acid and 1-(2-(5-oxo-6-phenyl-2,5-dihydro-1,2,4-triazino-3-yl)phenyl)-3-phenylpyrrolidine-2,5-dione.

Formation of the products mentioned, as we consider, may be explained by the fact that the electronic effect of the phenyl moiety cannot be characterized as an obvious donor or acceptor. Thus, reactivity of carbonyl groups is approximately equal, which, in turn, causes nonselective acylation of the amino group. Intermediates **A** and **B** formed undergo further dehydration. Dehydration of intermediate **A** leads to formation of the triazinoquinazoline system, at the same time such direction of dehydration is impossible for intermediate **B** in consequence of steric restrictions. In this case, there was the alternative direction of cyclisation followed by formation of the corresponding 1-(2-(5-oxo-6-phenyl-2,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl)phenyl)-3-phenylpyrrolidin-2,5-dione.

3-(2-Oxo-3-phenyl-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-6-yl)-2-phenylpropanoic acid (**4.1**) was isolated from the mixture of the products and characterized as an individual compound. The ^{1}H NMR spectral pattern of the compound mentioned was similar to the spectra of compounds **2.1-2.5**. Thus, signals of the carboxylic group at 12.59 ppm, the ABCD system of triazinoquinazoline protons and the carboxyalkyl fragment were present in ^{1}H NMR-spectra of **4.1**. The signals being characteristic for the phenyl moiety in position 3 were also observed.

The interaction of 3-(2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2H)-ones with camphoric anhydride was also studied. The reaction given above was especially interesting considering that among products of condensation of camphoric anhydride with diamines the



Scheme 3. Interaction 3-(2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2H)-ones with camphoric anhydride.

potent hypoglycemic agents were found [9]. According to the data of physicochemical methods the interaction of the compound mentioned occurred regioselectively and yielded 1,2,2-trimethyl-3-(3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)cyclopentan-1-carboxylic acids.

To confirm the structure of compounds **6.1-6.3** the complex of physicochemical methods such as LC-MS, ^{1}H NMR-, ^{13}C NMR- and mass-spectrometry was used. The molecular weight of compounds, signals of the carboxylic group (11.91-11.97 ppm) and protons of the quinazoline fragment in ^{1}H NMR spectra and ^{13}C NMR spectral pattern indicated formation of the triazinoquinazoline system, but we could not differentiate the product out of two alternative structures. The mass spectral (EI) pattern of compound **6.1** was characterized by the complex structure, but also did not allow definitely evaluating direction of the reaction. Primary fragmentation was caused by the decarboxylation process (the signal with m/z = 321, I_{rel} = 29.0% (F_2)) and degradation of triazine fragments on bonds C2-C3 and N4-N5 (signals with m/z = 325, I_{rel} = 16.8% (F_2)). The subsequent elimination of CO from the fragment ion F_2 yielded the fragmental ion F_3 (the signal with m/z = 297, I_{rel} = 30.4%). Degradation of the cyclopentane moiety of fragments F_1 and F_2 caused the presence of signal series, including the most intensive with m/z = 198. Elimination of the cycloalkyl fragment from F_2 yielded an ion with m/z = 171 and the intensity of 28.4% being typical for the triazinoquinazoline system and fragmentation was undergone according to the directions described [10]. Considering that the complex of spectral methods did not allow to identify the structure of the products formed the X-ray structural study was used; it showed that we obtained 1,2,2-trimethyl-3-(3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoln-6-yl)cyclopentan-1-carboxylic acids.

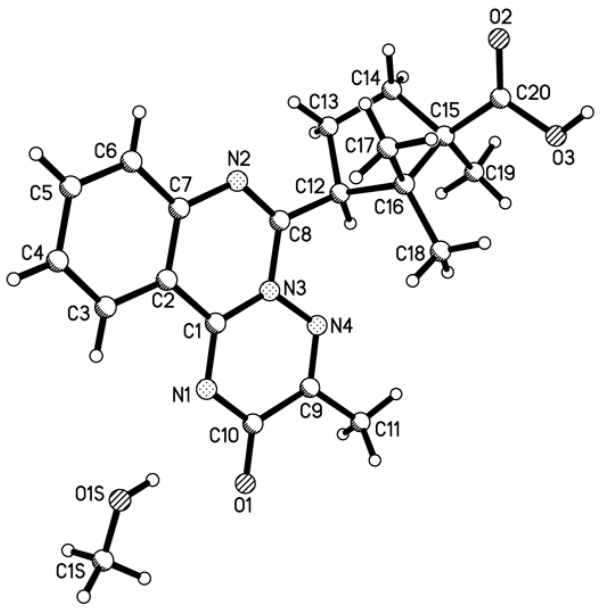


Fig. 1. The molecular structure of compound **6.1** according to X-ray diffraction data.

The tricyclic fragment of molecule **6.1** is planar within 0.03 Å. The saturated five-membered substituent adopts an envelope conformation where deviation of the C16 atom from the mean plane of the remaining atoms of the ring is -0.65 Å. The five-membered ring is turned in such way that its planar part is slightly non-coplanar to the N2-C8 endocyclic double bond (the N2-C8-C12-C13 torsion angle is 32.5(3)°). It can be assumed that C12-H…N4 (H…N 2.31 Å C-H…N 104°) and C13-H13b…N2 (H…N 2.43 Å C-H…N 107°) weak intramolecular hydrogen bonds promote such location of the saturated ring. The methyl group at the C15 atom is located in the axial position (the C13-C14-C15-C19 torsion angle is 91.3(3)°) and the carboxyl group has equatorial orientation and is almost coplanar to the C14-C15 endocyclic bond (the C13-C14-C15-C20 and C14-C15-C20-O2 torsion angles are 147.8(2)° and -12.1(3)°, respectively). The presence of the geminal substituents at the neighbouring atoms of the pentane ring leads to the appearance of the significant steric repulsion (the shor-

tened intramolecular contacts: H12…H19c 2.27 Å (the van der Waals radii sum [11] is 2.34 Å), H12…C19 2.84 Å (2.87 Å), H17a…C8 2.60 Å (2.87 Å), H17b…C13 2.75 Å (2.87 Å), H17b…C14 2.66 Å (2.87 Å), H17c…C20 2.55 Å (2.87 Å), H18c…C19 2.63 Å (2.87 Å), H18c…H19a 2.22 Å (2.34 Å), H19a…C18 2.66 Å (2.87 Å), H19c…C12 2.77 Å (2.87 Å)), it causes elongation of the C12-C16 bond up to 1.567(3) Å as compared with its mean value [12] 1.556 Å.

In the crystal phase molecules **6.1** form the zig-zag chains along the [0 1 0] crystallographic direction due to formation of the O3-H…O1' (1.5-x, -0.5+y, 0.5-z) intermolecular hydrogen bond (H…O 1.93 Å, O-H…O 164°), it promotes the elongation of the C10-O1 bond up to 1.233(3) Å (the mean value is 1.210 Å). The methanol solvate and **6.1** molecules are bonded by the O1s-H…N1 intermolecular hydrogen bond (H…N 2.32 Å O-H…N 156°).

Experimental Part

Melting points were determined in open capillary tubes and were uncorrected. The elemental analyses (C, H, N, S) were performed using an ELEMENTAR vario EL Cube analyzer (USA). Analyses were indicated by the symbols of the elements or functions within ±0.3% of the theoretical values. IR spectra (4000–600 cm^{-1}) were recorded on a Bruker ALPHA FT-IR spectrometer (Bruker Bioscience, Germany) using a module for measuring attenuated total reflection (ATR). ^{1}H NMR spectra (400 MHz) and ^{13}C NMR spectra (100 MHz): were recorded on Varian-Mercury 400 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) spectrometers with TMS as an internal standard in DMSO-d6 solution. LC-MS were recorded using the chromatography/mass spectrometric system consisting of a "Agilent 1100 Series" high performance liquid chromatograph (Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipped with a diode-matrix and a "Agilent LC/MSD SL" mass-selective detector (atmospheric pressure chemical ionization – APCI). Electron impact mass spectra (EI-MS) were recorded on a Varian 1200 L instrument at 70 eV (Varian, USA). The purity of all the compounds obtained was checked by 1H-NMR and LC-MS.

Compounds **1.1-1.6** were obtained according to the synthetic protocols described [1].

The general method for preparation of 2-methyl-3-(2-oxo-3-aryl-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)propanoic acids.

To the suspension of 0.003 M of the corresponding 3-(2-aminophenyl)-6-aryl-1,2,4-triazin-5(2H)-one in 15 ml of acetic acid add 0.003 M (0.34 g) 2-methylsuccinic anhydride, reflux the mixture for 6 hours and cool. Evaporate the solvent under low pressure, crystallize the residue from methanol.

2-Methyl-3-(2-oxo-3-phenyl-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)propanoic acid (2.1). Yield – 52.32%. M.p. – 210-212°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.36 (s, 1H,COOH), 8.57 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-8), 8.01 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-9), 7.84 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-8), 7.77 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-10), 3.70 (dd,J = 16.1, 6.8 Hz, 1H, -$\underline{CH_2}$CH(CH_3)COOH), 3.30-3.10 (m, J = 19.8, 6.6 Hz, 2H, -$\underline{CH_2CH}$(CH_3)COOH), 2.21 (s, 1H, CH_3), 1.30 (d, J = 6.7 Hz, 3H, -CH_2CH($\underline{CH_3}$)COOH); LC-MS, m/z = 299 [M +1]; Calculated for: $C_{15}H_{14}N_4O_3$: C, 60.40; H, 4.73; N, 18.78; Found: C, 60.44; H, 4.78; N, 18.81.

2-Methyl-3-(2-oxo-3-phenyl-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-6-yl)propanoic acid (2.2). Yield – 46.32%. M.p. – 226-228°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.36 (s, 1H,COOH), 8.57 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-8), 8.28 (d, J = 7.1 Hz, 2H, 3-Ph H-2, 6), 8.01 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-9), 7.84 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-8), 7.77 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-10), 7.68-7.45 (m, 3H, 3-Ph H-3,4,5), 3.70 (dd,J = 16.1, 6.8 Hz, 1H, -$\underline{CH_2}$CH(CH_3)COOH), 3.30-3.10 (m, J = 19.8, 6.6 Hz, 2H, -$\underline{CH_2CH}$(CH_3)COOH), 1.30 (d, J = 6.7 Hz, 3H, -CH_2CH($\underline{CH_3}$)COOH); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 159.46, 158.23, 158.02, 152.52, 151.00, 149.38, 143.24, 135.40, 132.12, 131.29, 129.35, 128.52, 128.38, 127.37, 125.47, 119.24, 99.55, 36.03, 35.81, 25.50, 17.18; HSQC (cross-peaks) 1.27/17.37, 3.19/36.17, 3.68/35.99, 7.56/128.70, 7.58/131.58, 7.74/128.83, 7.82/127.68, 7.99/135.74, 8.25/129.69, 8.54, 125.78; LC-MS, m/z = 361 [M +1]; Calculated for: $C_{20}H_{16}N_4O_3$: C, 66.66; H, 4.48; N, 15.55; Found: C, 66.68; H, 4.51; N, 15.58.

2-Methyl-3-(2-oxo-3-(p-tolyl)-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-6-yl)propanoic (2.3). Yield – 52.6%. M.p. – 238-241°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.11 (s, 1H, COOH), 8.60 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-8), 8.23 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, 3-Ph H-2,6), 7.97 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-9), 7.82 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-8), 7.72 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-10), 7.33 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 3-Ph H-3,5), 3.73 (dd, *J* = 17.4, 8.3 Hz, 1H $\underline{CH_2}$CH(CH_3)COOH), 3.40-3.17 (m, 2H, $\underline{CH_2CH}$(CH_3)COOH), 2.45 (s, 3H, CH_3), 1.36 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH_2CH($\underline{CH_3}$)COOH); LC-MS, m/z = 375 [M +1]; Calculated for: $C_{21}H_{18}N_4O_3$: C, 67.37; H, 4.85; N, 14.96; Found: C, 67.41; H, 4.89; N, 15.01.

3-(3-(4-Ethylphenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)-2-methylpropanoic acid (2.4). Yield – 57.14%. M.p. – 218-220°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.11 (s, 1H, COOH), 8.60 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-8), 8.24 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, 3-Ph H-2,6), 7.97 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-9), 7.83 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-8), 7.73 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-10), 7.36 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, 3-Ph H-3,5), 3.73 (dd,*J* = 17.6, 8.3 Hz, 1H, $\underline{CH_2}$CH(CH_3)COOH), 3.34-3.18 (m, 2H, $\underline{CH_2CH}$(CH_3)COOH), 2.75 (dd, *J* = 13.7, 6.4 Hz, 2H, $\underline{CH_2}CH_3$), 1.36 (d, *J* = 5.7 Hz, 3H, CH_2CH($\underline{CH_3}$)COOH), 1.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, $CH_2\underline{CH_3}$); LC-MS, m/z = 389 [M +1]; Calculated for: $C_{22}H_{20}N_4O_3$: C, 68.03; H, 5.19; N, 14.42; Found: C, 68.07; H, 5.22; N, 14.45.

3-(3-(4-Isopropyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)-2-methylpropanoic acid (2.5). Yield – 45.0%. M.p. – 179-183°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.32 (s, 1H, COOH), 8.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-8), 8.22 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, 3-Ph H-2,6), 8.01(t, 1H, *J* = 8.0, H-9), 7.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H, H-8), 7.77 (t,

J = 7.4 Hz, 1H, H-10), 7.45 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, 3-Ph H-3, 5), 3.69 (dd, *J* = 16.0, 6.8 Hz, 1H, -$\underline{CH_2}$CH(CH_3)COOH), 3.31-3.14 (m, 2H, -$\underline{CH_2}\underline{CH}$($CH_3$)COOH), 3.00 (dt, *J* = 12.9, 6.6 Hz, 1H, -$\underline{CH}$(CH_3)$_2$), 1.42-1.13 (m, 9H, -CH_2CH($\underline{CH_3}$)COOH, -CH($\underline{CH_3}$)$_2$)). LC-MS, m/z = 403 [M +1]; Calculated for: $C_{23}H_{22}N_4O_3$: C, 68.64; H, 5.51; N, 13.92; Found: C, 68.66; H, 5.55; N, 13.97.

3-(3-(4-Ethoxypenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino [2,3-c]quinazoline-6-yl)-2-methylpropanoic acid (2.6). Yield – 56.2%. M.p. – 244-247°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.10 (s, 1H, COOH), 8.60 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-8), 8.37 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, 3-Ph H-2,6), 7.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-9), 7.82 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-8), 7.72 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-10), 7.02 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, 3-Ph H-3, 5), 4.14 (m, 2H, -O$\underline{CH_2}CH_3$), 3.74 (dd, *J* = 16.7, 7.5 Hz, 1H, $\underline{CH_2}$CH(CH_3)COOH), 3.35-3.18 (m, 2H, $\underline{CH_2}\underline{CH}$($CH_3$)COOH), 1.45 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H, O$CH_2\underline{CH_3}$), 1.36 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH_2CH($\underline{CH_3}$)COOH); LC-MS, m/z = 405 [M +1]; Calculated for: $C_{22}H_{20}N_4O_4$: C, 65.34; H, 4.98; N, 13.85; Found: C, 65.38; H, 4.99; N, 13.89.

3-Methyl-1-(2-(6-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1, 2,4-triazin-3-yl)phenyl)pyrrolidine-2,5-dione (3.1). Yield – 12.1%. M.p. – 249-251°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 13.90 (s, 1H, NH), 7.79 (d, 1H, H-3), 7.73 (t, 1H, H-5), 7.63 (t, 1H, H-4), 7.42 (d, 1H, H-6), 3.35-2.83 (m, 2H, -CO$\underline{CH_2}\underline{CH}$($CH_3$)CO-), 2.39 (m, 1H -CO$\underline{CH_2}\underline{CH}$($CH_3$)CO-), 2.24 (s, 1H, CH_3), 1.32 (d, 3H, -COCH_2CH($\underline{CH_3}$)CO-); LC-MS, m/z = 299 [M +1]; Calculated for: $C_{15}H_{14}N_4O_3$: C, 60.40; H, 4.73; N, 18.78; Found: C, 60.43; H, 4.76; N, 18.80.

The synthetic method of 3-(2-oxo-3-phenyl-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-6-yl)-2-phenylpropanoic acid.

To the suspension of 0.003 M (0.79 g) of 3-(2-aminophenyl)-6-phenyl-1,2,4-triazin-5(2H)-one in 15 ml of acetic acid add 0.003 M (0.53 g) 2-plsuccinic anhydride, reflux the mixture for 6 hours and cool. Evaporate the solvent under low pressure, then add 10 ml of methanol. Filter the precipitate formed and crystallize from propanol-2.

3-(2-Oxo-3-phenyl-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)-2-phenylpropanoic acid (4.1). Yield – 56.3%. M.p. – 186-188°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.59 (s, 1H, COOH), 8.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-11), 8.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, 3-Ph H-2,6), 8.03 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-9), 7.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-8), 7.78 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-10), 7.71-7.05 (m, 8H, 3-Ph H-3,4,5, 6-Ph H-2, 3, 4, 5, 6), 4.43 (dd, *J* = 9.5, 4.7 Hz, 1H, $CH_2\underline{CH}$(Ph)COOH), 4.07 (dd, *J* = 17.6, 9.4 Hz, 1H, $\underline{CH_2}$CH(Ph)COOH), 3.53 (dd, *J* = 17.6, 4.7 Hz, 1H, $\underline{CH_2}$CH(Ph)COOH). LC-MS, m/z = 423 [M +1]; Calculated for: $C_{25}H_{18}N_4O_3$: C, 71.08; H, 4.30; N, 13.26; Found: C, 71.10; H, 4.33; N, 13.28.

1-(2-(5-Oxo-6-phenyl-2,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl)phenyl)-3-phenylpyrrolidine-2,5-dione (4.1). Yield – 21.4%. M.p. – 223-224°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ δ 13.88 (s, 1H, NH), 8.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, 3-Ph H-2,6), 7.79 (d, 1H, H-3), 7.73 (t, 1H, H-5), 7.71-7.05 (m, 10H, H-4, H-6, 3-Ph H-3,4,5, 6-Ph H-2, 3, 4, 5, 6), 4.02 (dd, *J* = 17.6, 9.4 Hz, 2H, $\underline{CH_2}$CH(Ph)), 3.44 (dd, *J* = 17.6, 4.7 Hz, 1H, $CH_2\underline{CH}$(Ph)). LC-MS, m/z = 423 [M +1]; Calculated for: $C_{25}H_{18}N_4O_3$: C, 71.08; H, 4.30; N, 13.26; Found: C, 71.13; H, 4.35; N, 13.31.

The general method for synthesis of substituted 1,2,2-trimethyl-3-(3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino [2,3-c]quinazolin-6-yl)cyclopentane-1-carboxylic acids. To the suspension of 0.003 M (0.79 g) of the corresponding 3-(2-aminophenyl)-6-R-1,2,4-triazin-5(2H)-one in 15 ml of acetic acid add 0.003 M (0.91 g) of camphoric anhydride, heat the mixture at 80°C for 30 min, then reflux for 6 hours and cool. Evaporate the solvent under low pressure, then add 20 ml of methanol. Filter the precipitate formed and dry.

1,2,2-Trimethyl-3-(3-methyl-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)cyclopentane-1-carboxylic acid (6.1). Yield – 31.2%. M.p. = 285-296°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 11.91 (s, 1H, COOH), 8.55 (d, J = 8.0 Hz, 1H, triazinoquinazoline H-11), 7.92 (t, J = 7.3 Hz, 1H, triazinoquinazoline H-9), 7.79 (d, J = 8.1 Hz, 1H, triazinoquinazoline H-8), 7.67 (t, J = 7.5 Hz, 1H, triazinoquinazoline H-10), 4.60 (t, J = 8.9 Hz, 1H, cyclopentane H-3), 2.74-2.53 (m, 2H, cyclopentane H-4,5), 2.40 (s, 3H, triazinoquinazoline-3 CH_3), 2.12-1.92 (m, 1H, cyclopentane H-5), 1.54 (t, J = 9.4 Hz, 1H, cyclopentane H-4), 1.34 (s, 3H, cyclopentane-1 CH_3), 1.16 (s, 3H, cyclopentane-2 CH_3), 0.79 (s, 3H, cyclopentane-2 CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 176.41, 159.64, 154.20, 153.53, 151.77, 142.86, 134.68, 127.90, 127.20, 125.29, 119.04, 56.10, 48.21, 45.55, 32.31, 25.74, 22.90, 21.85, 21.33, 17.58; EI-MS m/z (% rel.) 366 (5.7), 325 (16.8), 321 (29.0), 310 (6.9), 298 (5.0), 297 (30.4), 296 (7.2), 281 (7.0), 280 (39.7), 279 (7.7), 265 (6.8), 264 (23.4), 240 (8.2), 239 (61.3), 238 (16.4), 236 (12.3), 227 (6.4), 226 (8.1), 212 (9.5), 211 (24.1), 210 (62.0), 209 (17.1), 199 (14.3), 198 (100), 197 (15.5), 196 (23.4), 185 (14.2), 183 (13.4), 181 (5.4), 172 (11.3), 171 (28.4), 170 (8.8), 169 (8.7), 168 (6.3), 167 (6.8), 155 (10.4), 145 (7.0), 144 (7.4), 143 (36.7), 142 (11.2), 140 (7.8), 139 (14.3), 129 (13.2), 118 (16.5), 117 (8.9), 116 (10.7), 115 (9.3), 112 (7.1), 111 (18.2), 110 (8.5), 109 (21.9), 107 (7.0), 105 (5.0), 104 (5.4), 98 (6.3), 89 (5.5), 87 (6.5), 86 (5.2), 85 (19.3), 83 (13.1), 81 (27.4), 80 (5.9), 79 (15.5), 77 (21.9), 76 (14.0), 75 (11.9), 74 (5.0), 73 (19.8), 69 (15.9), 68 (5.8), 67 (10.5), 57 (23.3), 56 (24.1), 55 (64.5), 54 (10.1), 53 (10.9), 50 (8.0), 49 (80.3), 48 (10.8), 47 (28.2), 45 (28.3), 44 (39.1), 43 (89.9), 42 (21.2), 41 (5.3); LC-MS m/z = 369 (M+1); Calculated for $C_{20}H_{22}N_4O_3$ C, 65.56; H, 6.05; N, 15.29; Found C, 65.58; H, 6.07; N, 15.31; O, 13.12.

1,2,2-Trimethyl-3-(3-phenyl-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)cyclopentane-1-carboxylic acid (6.2). Yield – 18.7%. M.p. – 266-269°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 11.94 (s, 1H, COOH), 8.63 (d, J = 7.8 Hz, 1H, triazinoquinazoline H-11), 8.32

(d, J = 6.9 Hz, 1H, triazinoquinazoline-3 Ph H-2, 6), 7.97 (t, J = 7.3 Hz, 1H triazinoquinazoline H-9), 7.85 (d, J = 8.0 Hz, 1H, triazinoquinazoline H-8), 7.73 (t, J = 7.4 Hz, 1H, triazinoquinazoline H-10), 7.67-7.40 (m, 3H, triazinoquinazoline-3 Ph H-3,4,5), 4.76 (t, J = 9.0 Hz, 1H, cyclopentane H-3), 2.82-2.57 (m, 1H, cyclopentane H-4, 5), 2.19-1.96 (m, 1H, H-5), 1.69-1.49 (m, 1H, cyclopentane, H-4), 1.40 (s, 1H, cyclopentane-1 CH_3), 1.17 (s, 1H, cyclopentane-2 CH_3), 0.88 (s, 1H, cyclopentane-2 CH_3). LC-MS m/z = 431 (M+1); Calculated for $C_{25}H_{24}N_4O_3$ C, 70.08; H, 5.65; N, 13.08; Found: C, 70.11; H, 5.68; N, 13.11.

1,2,2-Trimethyl-3-(3-(4-isopropylphenyl)-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)cyclopentane-1-carboxylic acid (6.3). Yield – 34.81%. M.p. – 270-272°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 11.97 (s, 1H, COOH), 8.63 (d, J = 7.9 Hz, 1H, triazinoquinazoline H-11), 8.27 (d, J = 8.1 Hz, , triazinoquinazoline-3 Ph H-2, 6), 7.97 (t, J = 7.5 Hz, 1H, triazinoquinazoline H-9), 7.85 (d, J = 8.1 Hz, 1H, triazinoquinazoline H-8), 7.73 (t, J = 7.4 Hz, 1H, triazinoquinazoline H-10), 7.39 (d, J = 8.1 Hz, 1H, triazinoquinazoline-3 Ph H-3,5), 4.77 (t, J = 9.0 Hz, 1H, cyclopentane H-3), 3.02 (t, J = 10.2 Hz, 1H, $\underline{CH}(CH_3)_2$, 2.80-2.54 (m, 1H, cyclopentane H-4, 5), 2.24-1.97 (m, 1H, cyclopentane-1 CH_3), 1.66-1.53 (m, 1H, cyclopentane H-4), 1.42 (s, 1H, cyclopentane-1 CH_3), 1.33 (d, J = 6.8 Hz, 6H, $CH(\underline{CH_3})_2$), 1.19 (s, 1H, cyclopentane-2 CH_3), 0.88 (s, 1H, cyclopentane-2 CH_3); LC-MS m/z = 471 (M+1); Calculated for $C_{28}H_{30}N_4O_3$ C, 71.47; H, 6.43; N, 11.91; Found: C, C, 71.49; H, 6.45; N, 11.94

X-ray Experimental Part

The colourless crystals of **6.1** ($C_{20}H_{20}N_4O_3$) are monoclinic. At 193 K a = 10.332(1), b = 16.562(2), c = 12.756(1) Å, β = 113.245(5)°, V = 2005.5(4) Å ^{3}, M_r = 364.40, Z = 4, space group $P2_1/n$, d_{calc} = 1.207 g/cm^3, μ(MoKα) = 0.083 mm^{-1}, F(000) = 768. Intensities of 24236 reflections (3501 independent, R_{int}=0.053) were measured on a "Bruker-Apex2" diffractometer (graphite monochromated MoKα radiation, CCD detector, ω-scaning, $2\Theta_{max}$ = 50°).

The structure was solved by the direct method using a SHELXTL package [13]. Positions of the hydrogen atoms were located from electron density difference maps and refined by the "riding" model with U_{iso} = nU_{eq} (n = 1.5 for methyl and hydroxyl groups and n=1.2 for other hydrogen atoms) of the carrier atom. Full-matrix least-squares refinement against F^2 in anisotropic approximation for non-hydrogen atoms using 3438 reflections was converged to wR_2 = 0.199 (R_1 = 0.067 for 2223 reflections with F>4σ(F), S = 1.018). The final atomic coordinates, and crystallographic data for molecule **6.1** were deposited from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, CB2 1EZ, UK (fax: +44-1223-336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk). They are available on request quoting the deposition numbers CCDC 1027014).

References

1. *Sergeieva T. Yu., Voskoboynik O. Yu., Okovytyy S. I., Kovalenko S. I., Shishkina S. V., Shishkin O. V., Leszczynski J. J. Phys. Chem. A., 2014, 118, pp.1895-1905. doi: 10.1021/jp4052616.*
2. *Kovalenko S. I., Nosulenko I. S., Voskoboynik A. Yu., Berest G. G., Antipenko L. M., Antipenko A. N., Katsev A. M. Med. Chem. Res., 2013, 22(6), pp.2610-2632. doi: 10.1007/s00044-012-0257-x.*
3. *Kovalenko S. I., Nosulenko I. S., Voskoboynik A. Yu., Berest G. G., Antipenko L. M., Antipenko A. N., Katsev A. M. Sci. Pharm., 2012, 80, pp.837-865. 10.3797/scipharm.1208-07.*
4. *Berest G. G., Voskoboynik O. Yu., Kovalenko S. I., Nosulenko I. S., Antipenko L. M., Antipenko O. M., Shvets V. M., Katsev A. M. Sci. Pharm., 2012, 80 (1), pp.37-65. doi:10.3797/scipharm.1111-15.*
5. *Berest G. G., Voskoboynik A. Yu., Kovalenko S. I., Antipenko A. M., Nosulenko I. S., Katsev A. M., Shandrovskaya A. S. Eur. J. Med. Chem., 2011, 46 (12), pp.6066-6074. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.10.022.*
6. *Voskoboynik A. Yu., Scorina D. Yu., Sergeieva T. Yu., Kovalenko S. I., Okovytyy S. I., Omelchenko I. V., Shishkin O. V. J. Het. Chem. (in press) doi: 10.1002/jhet.2120.*
7. *UA Utility Model Patent №U201214626 Salts of (3-R-8-R1-9-R2-10-R3-11-R4-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl) alkylcarboxylic acids improving physical endurance of body Stepaniuk H. I., Pochelova O. V., Chornoivan N. H., Voskoboinik O. Y., Skoryna D. Y., Kovalenko S. I. Published 20.12.2012.*
8. *UA Utility Model Patent №U201306088 Use of sodium salt of 4-(2-oxo-3-methyl-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]-quinazolin-6-yl) butanoic acid as cerebroprotective agents Semenenko N. O., Stepaniuk H. I., Semenenko A. I., Kovalenko S. I., Voskoboinik O. Yu., Skoryna D. Yu. Published 17.05.2013.*
9. *UA Utility Model Patent №U 2001064232 Antidiabetic agent "Diakamf", which reveals the hypoglycemic, antidiabetogenic and antioxidant action Merzlikin S. I., Chernykh V. P., Hladkykh O. I., Chueshov V. I., Pashnev P. D. Published 15.04.2002.*
10. *Karpenko O. V., Kovalenko S. I., Chekotylo O. O., Shishkina S. V. Heterocycles, 2007, 71 (3), pp.619-626. doi: 10.3987/COM-06-10971.*
11. *Zefirov Yu. V. Crystallography, 1997, 42 (5), pp.936-958.*
12. *Burgi H.-B., Dunitz J. D. Structure correlation. Vol. 2. VCH. Weinheim. 1994, pp.741-784.*
13. *Sheldrick G. M. Acta Crystallogr., Sect. A, 2008, A64, pp.112-122.*

Надійшла до редакції 01.10.2014 р.

UDC 54.057:547.831.7

SYNTHESIS AND *IN SILICO* SCREENING OF NOVEL 2-METHYLQUINOLINE-4-ONES BOUND WITH THE PYRAZOL-5-ONES MOIETY

V.O.Zubkov, N.I.Ruschak*, O.L.Kamenetska, I.S.Gritsenko

National University of Pharmacy
53, Pushkinska str., Kharkov, 61002, Ukraine. E-mail: vadim.zubkov@gmail.com
* Ivano-Frankivsk National Medical University

Key words: 2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one; pyrazol-5-one; Mannich base; molecular similarity

The 1,3-dicarbonyl derivatives of 2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one have been synthesized by alkylation of methylene active compounds with 3-dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one. These compounds are the convenient starting material for creating the new chemical libraries in the series of 3-heteryl substituted 2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-ones. In this work the examples of the synthesis of new quinolone-pyrazolone systems are presented. Their condensation with hydrazine hydrate resulted in the new derivatives of 2-methyl-3-[(5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-1,4-dihydroquinolin-4-ones. The estimation of novelty of the compounds obtained in such chemical databases as PubChem, ChemBl u Spresi has shown that these substances are not present in these sources, and the chemical scaffold – quinolone bound via the methylene bridge with azoles is new. Determination of 2D similarity of the compounds synthesized by standard molecular descriptors with the biologically active structures in the ChemBl_20 database has shown the uniqueness of a new quinolone scaffold and the potential anti-inflammatory activity for compounds of this series. The molecular similarity has been determined using the ChemAxon software (JKlustor, Instant JChem).

СИНТЕЗ І КОМП'ЮТЕРНИЙ СКРИНІНГ НОВИХ 2-МЕТИЛХІНОЛІН-4-ОНІВ, ЗВ'ЯЗАНИХ З ПІРАЗОЛОН-5-ОНОВИМ ФРАГМЕНТОМ

В.О.Зубков, Н.І.Рущак, О.Л.Каменецька, І.С.Гриценко

Ключові слова: *2-метил-1,4-дигідрохінолін-4-он; піразол-5-он; основа Маніха; молекулярна подібність*

Алкілуванням 3-диметиламінометил-2-метил-1,4-дигідрохінолін-4-оном метиленактивних сполук були синтезовані 1,3-дикарбонільні похідні 2-метил-1,4-дигідрохінолін-4-ону. Дані сполуки є зручним стартовим матеріалом для створення хімічних бібліотек в ряду 3-гетерилзаміщених 2-метил-1,4-дигідрохінолін-4-онів. У роботі наведені приклади синтезу нових хінолон-піразолонових систем. Конденсацією алкілованих метиленактивних сполук з гідразин гідратом отримані нові похідні 2-метил-3-[(5-оксо-4,5-дигідро-1Н-піразол-4-іл)метил]-1,4-дигідрохінолін-4-онів. Проведена оцінка новизни отриманих сполук за хімічними базами PubChem, ChemBl і Spresi показала, що дані сполуки зовсім не представлені в цих джерелах; а хімічний скаффолд – хінолон, з'єднаний через метиленовий місток з азолами, є новим. Визначення 2D схожості синтезованих речовин за стандартними молекулярними дескрипторами з біологічно активними структурами бази даних ChemBl_20 показало унікальність і перспективність нового хінолонового скаффолда в дизайні лікарських речовин, а також імовірність прояву протизапальної активності серед сполук даного ряду. Молекулярну схожість було визначено за допомогою програмного забезпечення ChemAxon (JKlustor, Instant JChem).

СИНТЕЗ И КОМПЬЮТЕРНЫЙ СКРИНИНГ НОВЫХ 2-МЕТИЛХИНОЛИН-4-ОНОВ, СВЯЗАННЫХ С ПИРАЗОЛ-5-ОНОВЫМ ФРАГМЕНТОМ

В.А.Зубков, Н.И.Рущак, О.Л.Каменецкая, И.С.Гриценко

Ключевые слова: *2-метил-1,4-дигидрохинолин-4-он; пиразол-5-он; основание Манниха; молекулярное подобие*

Алкилированием 3-диметиламинометил-2-метил-1,4-дигидрохинолин-4-оном метиленактивных соединений были синтезированы 1,3-дикарбонильные производные 2-метил-1,4-дигидрохинолин-4-она. Данные соединения являются удобным стартовым материалом для создания библиотек в ряду 3-гетерилзамещенных 2-метил-1,4-дигидрохинолин-4-онов. В работе приведены примеры синтеза новых хинолон-пиразолоновых систем. Конденсацией алкилированных метиленактивных соединений с гидразин гидратом получены новые производные 2-метил-3-[(5-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиразол-4-ил)метил]-1,4-дигидрохинолин-4-онов. Проведенная оценка новизны полученных соединений по химическим базам PubChem, ChemBl и Spresi показала, что данные соединения совсем не представлены в этих источниках, а химический скаффолд – хинолон, соединенный через метиленовый мостик с азолами, является новым. Определение 2D подобия синтезированных соединений по стандартным молекулярным дескрипторам с биологически активными структурами базы данных ChemBl_20 показало уникальность и перспективность нового хинолонового скаффолда в дизайне лекарственных веществ, а также вероятность проявления противовоспалительной активности среди соединений данного ряда. Молекулярное подобие было определено с помощью программного обеспечения ChemAxon (JKlustor, Instant JChem).

3-Substituted quinolones are attractive targets in medicinal chemistry over the past decades. It is connected with their ability to exhibit different types of the biological activity, and there are many successful stories of creation of medicines on their basis [1-3]. It was discovered earlier that 3-dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-ones could be effective alkylating agents in the reactions with N- and C-nucleophiles [4-5]. In continuation of our previous research efforts of increasing the molecular diversity of 3-substituted quinolones with various biologically important moieties it has been decided to expand the range of active methylene compounds using their reaction with 3-dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one, and then make some heterocyclization on the basis of the resulting products.

It is well known that 1,3-dicarbonyl compounds are convenient reagents in the synthesis of various 5- and 6-membered heterocycles according to the "2 + 3" and "3 + 3" strategies [6]. In relation to the objects of our studies, the molecular diversity expansion can be carried out as shown in Fig. 1. In this work the synthesis of new quinolone-pyrazol systems bound via the methylene group, namely derivatives of 2-methyl-3-[(5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-1,4-dihydroquinolin-4-ones is presented.

To estimate the novelty of the compounds planned to synthesize the literature search and structural web-search in such chemical databases as PubChem, ChemBl and Spresi were conducted at first [7-9]. The results obtained have shown that currently such compounds are not present in these chemical databases. As an example, the structures of the most similar substances according to 2D similarity methods with the Tanimoto coefficient for 3-[(3-amino-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-2-methyl-1,4-dihydroquinolin-4-one are given in Table.

The next step of our chemoinformatic studies was the preliminary estimation of the pharmacological potential of 2-methyl-3-[(5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-1,4-dihydroquinoline-4-ones. To achieve this purpose, the sdf ChemBl_20 database was chosen. This database is one of the most powerful tool of chemo- and bioinformatics and currently contains 1.463.270 distinct compounds, 13.520.737 activities, and 59.610 source documents. The platform of ChemAxon under free academic license was used as a software. The 2D similarity method was used, and considering the vast number of compounds in ChemBl-20, the clustering of the data was carried out by Bemis-Murcko algorithm. JKlustor was used for clustering and diversity analysis of chemical sets, JChem 15.2.23.0, 2015, ChemAxon (http://www.chemaxon.com). The search

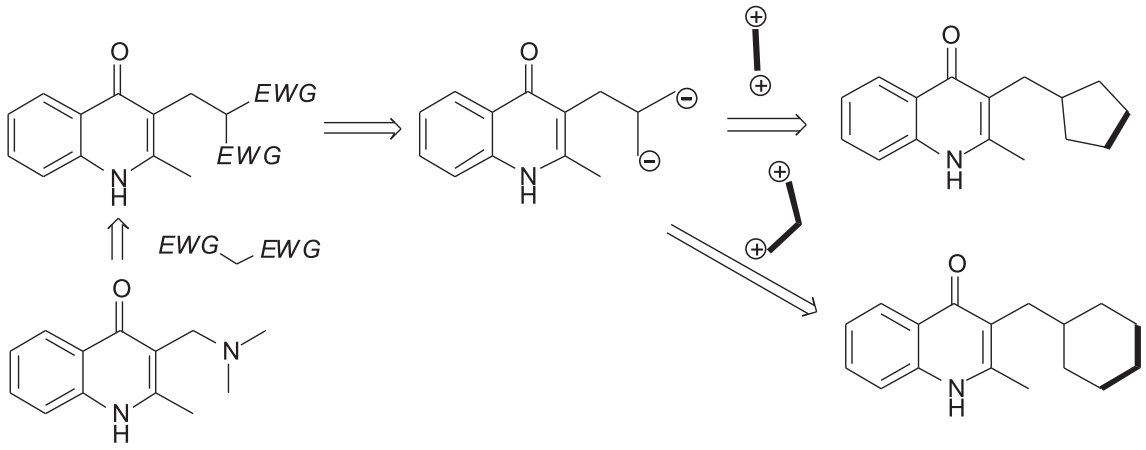
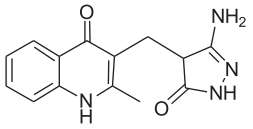
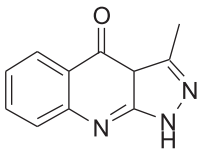
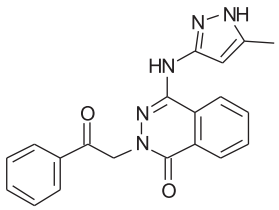
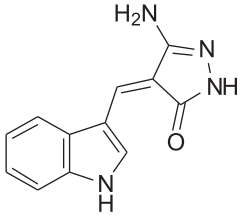


Fig. 1. The "2 + 3" and "3 + 3" strategies for the synthesis of new heterocycles of quinolin-4-ones derivatives.

Table

Reference structure:	PubChem Compound 67.25 million compounds	ChEMBL_20 1.46 million compounds	SPRESIweb 5.68 million compounds
	CID 73182817  Similarity threshold >= 85%	CHEMBL474651  Similarity – 75.03	Spresi RegNo: 0289308-000  Similarity – 70.02%

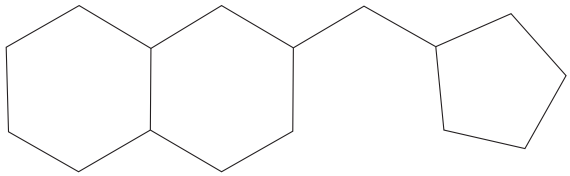


Fig. 2. Bemis-Murcko scaffold describing the compounds synthesized.

of the graph scaffold describing the compounds synthesized (Fig. 2) among Bemis and Murcko frameworks of the ChemBl database has shown that there are 1167 substances that correspond to this parameter.

For structure database management, search and analysis of data the Instant JChem software was used (Instant JChem 15.2.23.0, 2015, ChemAxon, http://www.chemaxon.com). To determine the molecular similarity, standard 2D molecular descriptors calculated using Instant JChem were applied.

Data analysis and visualization were carried out by constructing combinations of all possible scatter plots and radar charts. As a result, it has been found that the most similar compound is 3-substituted quinoxaline-2-one, CHEMBL2263312 (Fig. 3) that exhibits the anti-inflammatory activity on the carrageenan-induced rat paw edema model [10].

Thus, the data analysis of 2D similarity of 2-methyl-3-[(5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-1,4-dihydroquinoline-4-ones with distinct compounds from the ChemBl database has shown that the biological activity of this scaffold has not been studied yet, and for more accurate determination of similarity with the known ligands it is necessary to perform the 3D ligand-based virtual screening for these compounds.

The synthesis of the target compounds **3a, b,** and **6** was carried out as shown in Scheme. At first, the active methylene compounds – ethyl cyanoacetate, ethyl acetoacetate and diethyl malonate were alkylated with 3-dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one **1** with good yields using the method recently described [5]. The preliminary quaternization of 3-dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one with methyl iodide allows to alkylate the activated C-nucleophiles under mild conditions and in good yields. In this study we did not isolate the intermediate quaternized quinolone salt from the reaction medium, the one-pot synthesis was performed to yield the resulting products **2a-c**. Then condensation of compounds **2a, b** with hydrazine hydrate and further intramolecular cyclization *in situ* to the corresponding derivatives of pyrazole-5-ones was carried out [11].

In the case of alkylated diethylmalonate **2c** the synthesis of the target pyrazolidine-3,5-dione **6** was conducted somewhat differently using the method described by *Metwally et al.* [12]. Condensation of the substituted diethylmalonate **2c** with hydrazine hydrate occurred ambiguously and led to formation of the mixture of mono- **5** and dihydrazide **6** in the

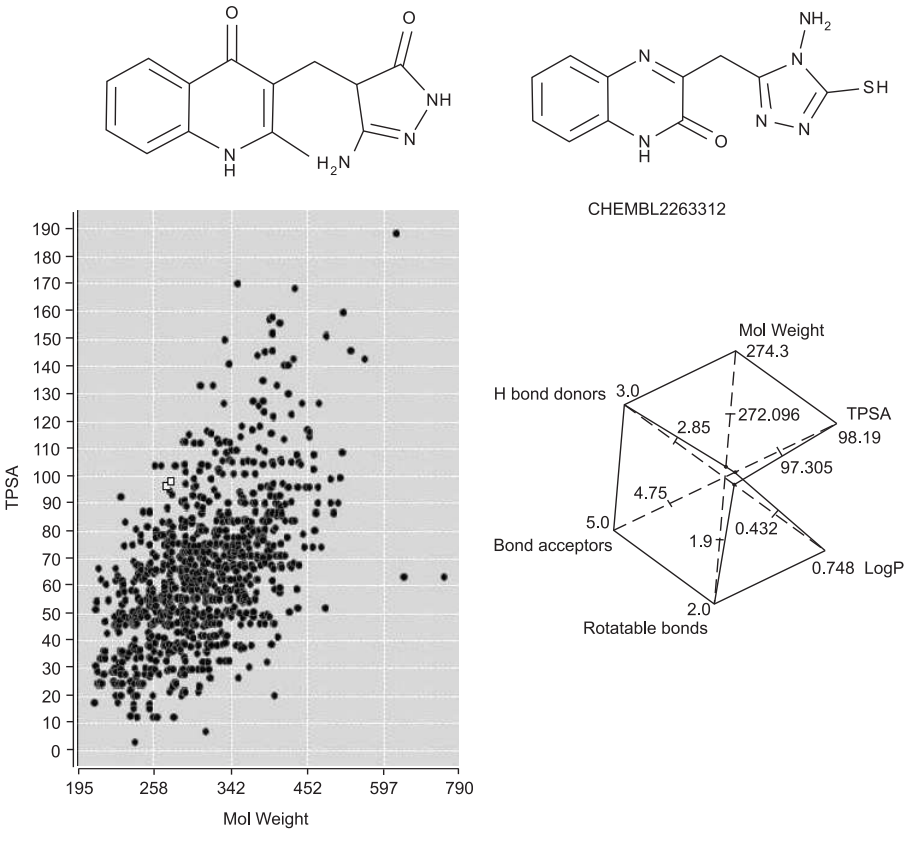
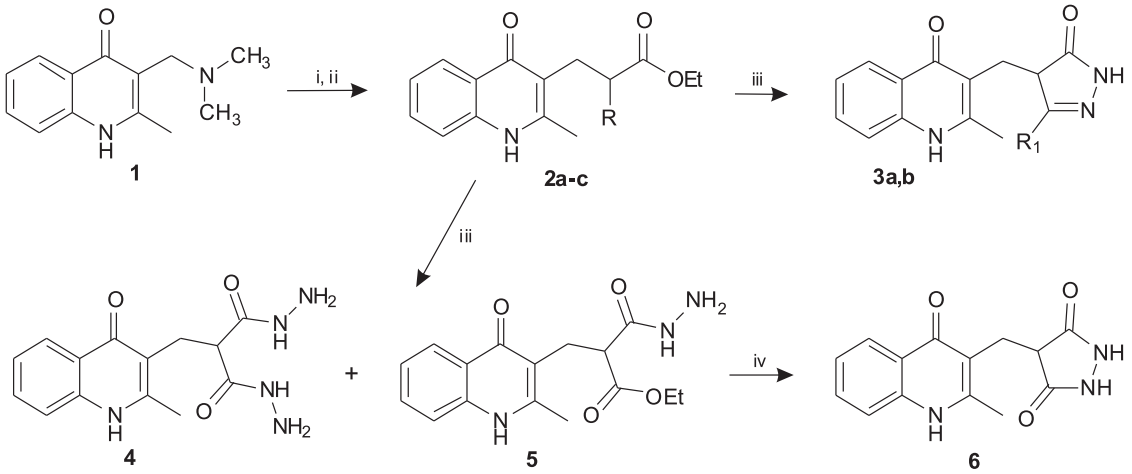


Fig. 3. A graphical representation of the most similar structure from the ChemBl database with the compound studied.



2a) R = CN; 2b) R = $COCH_3$; 2c) R = $COOC_2H_5$

3a) $R_1 = NH_2$; 3b) $R_1 = CH_3$

i - CH_3I; **ii** - R-$CH_2COOC_2H_5$, EtONa; **iii** - $NH_2NH_2xH_2O$; **iv** - EtONa

Scheme

ratio of approximately 80:20. These products were separated quite easily due to their different solubility in ethanol. The subsequent intramolecular cyclization of monohydrazide **5** in the presence of sodium ethylate led to formation of pyrazolidine-3,5-dione with a good yield.

Experimental Part

Melting points were determined in open capillary tubes and were uncorrected. The proton nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) spectra were recorded on a Varian Mercury VX-200 (200 MHz) in DMSO-D_6 using tetramethylsilane [$(CH_3)_4Si$] as an internal standard. Elemental analysis was performed on an Elementar Vario EI elemental analyzer.

3-Dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one 1 was obtained using the method [4].

Ethyl 2-cyano-3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propanoate 2a. To 1.08 g (5 mmol) of 3-dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one in 20 ml of absolute ethanol add 0.5 ml (8 mmol) of methyl iodide and stir the mixture at room temperature for 15 hours. Then raise the temperature to 60°C and allow to stand for an hour. Cool the solution to room temperature, add 0.6 g (5.3 mmol) of ethyl cyanoacetate, and while mixing thoroughly add by portions the solution of sodium ethylate prepared from 0.12 g of metal sodium (5.3 mmol) and 10 ml of absolute ethanol. Reflux the reaction mixture until no trimethylamine is evolved. Add water, acidify the mixture to pH 5. Filter the precipitate obtained, wash and recrystallize from ethanol. Yield – 1.03 g (76%). M.p. – 211-213°C. ^{1}H NMR – δ, ppm – 11.57 (s, 1H), 8.04 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.61 (ddt, *J* = 9.2, 4.3, 2.1 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.38-7.17 (m, 1H), 4.38 (dd, *J* = 8.9, 6.7 Hz, 1H), 4.16 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.13 (td, *J* = 14.0, 8.1 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). Anal. Calcd for $C_{16}H_{16}N_2O_3$; C, 67.59; H, 5.67; N, 9.85; found: C, 67.73; H, 5.68; N, 9.87.

Compounds **2b, c** were synthesized by the same procedure.

Ethyl 2-[(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl]-3-oxobutanoate 2b. The compound was recrystallized from ethanol. Yield – 0.92 g (64%). M.p. – 148-150°C. ^{1}H NMR, δ, ppm, 11.47 (s, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.58 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.6 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.25 (ddd, *J* = 8.2, 6.8, 1.3 Hz, 1H), 4.17-3.92 (m, 3H), 2.89 (qd, *J* = 13.8, 7.3 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.05 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). Anal. Calcd for $C_{17}H_{19}NO_4$; C, 67.76; H, 6.36; N, 4.65; found: C, 67.64 ; H, 6.37; N, 3.39.

1,3-Diethyl 2-[(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl]propanedioate 2c. The compound was recrystallized from ethanol. Yield – 1.14 g (69%). The melting point and data of ^{1}H NMR spectra coincide with those given in the work [5].

3-[(3-Amino-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-2-methyl-1,4-dihydroquinolin-4-one 3a. Dissolve 0.5 g (1.76 mmol) of ethyl 2-cyano-3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl) propanoate **2a** while stirring in 5 ml ethanol. Add dropwise 0.1 g (2.06 mmol) of hydrazine hydrate to the resulting solution and stir at 70°C for 16 hours. Evaporate the solvent under reduced pressure. Treat the residue with water and 3 ml 1 M of acetic acid. Filter the precipitate obtained, wash and recrystallize from dimethylformamide. Yield – 0.34 g (72%). M.p. > 300°C. ^{1}H NMR – δ, ppm 11.62 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 8.04 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.61 (ddd, *J* = 8.3, 6.7, 1.5 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.99 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.98 (dd, *J* = 7.6, 2.7 Hz,

2H), 2.44 (s, 3H). Anal. Calcd for $C_{14}H_{14}N_4O_2$; C, 62.21; H, 5.22; N, 20.73; found: C, 62.05; H, 5.21; N, 23.42 .

2-Methyl-3-[(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-1,4-dihydroquinolin-4-one 3b was prepared by the same procedure and under the same conditions using ethyl 2-[(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl]-3-oxobutanoate **2b** and hydrazine hydrate. Yield – 0.46 g (57%). M.p. > 300°C. ^{1}H NMR δ, ppm – 11.56 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.01 (dd, *J* = 7.4, 1.6 Hz, 1H), 7.43 (td, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H), 7.39 (td, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 3.87 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.95 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.04 (s, 3H). Anal. Calcd for $C_{15}H_{15}N_3O_2$; C, 66.90; H, 5.61; N, 15,60; found: C, 67.02; H, 5.60; N, 17.63.

Ethyl 2-(hydrazinecarbonyl)-3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propaneate 5. To the solution of 0.95 5 g (3.16 mmol) of 1,3-diethyl 2-[(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl) methyl]propanedioate **2c** in 10 ml of ethanol add 0.15 g (3 mmol) of hydrazine hydrate. Stir the mixture at room temperature for 12 hours, separate dihydrazide **4** (0.13 g) by filtration. After evaporating the filtrate and treating the residue successively with methylene chloride and isopropanol obtain monohydrazide **5** and recrystallize from ethanol. Yield – 0.62 g (55%). M.p. – 194-196°C. ^{1}H NMR δ, ppm – 11.40 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.03 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.58 (ddd, *J* = 8.3, 6.8, 1.6 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.23 (ddd, *J* = 8.2, 6.8, 1.5 Hz, 1H), 4.15-3.90 (m, 3H), 2.99-2.85 (m, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.06 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). Anal. Calcd for $C_{16}H_{19}N_3O_4$; C, 60.56; H, 6.03; N, 13.24; found: C, 60.46; H, 6.04; N,11.65.

2-[(2-Methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl) methyl]propanedihydrazide 4. Yield – 0.13 g (12%). M.p. – 281-283°C. ^{1}H NMR δ, ppm – 11.45 (s, 1H), 10.32 (br, s, 4H), 9.06 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 7.58 (ddd, *J* = 8.3, 6.8, 1.5 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.22 (ddd, *J* = 8.2, 6.8, 1.4 Hz, 1H), 3.94 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 2.91 (m, 2H), 2.41 (s, 3H). Anal.Calcd for $C_{14}H_{17}N_5O_3$; C, 55.44; H,5.65; N, 23.09; found: C, 55.33; H, 5.66; N, 20.78.

4-[(2-Methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl) methyl]pyrazolidine-3,5-dione 6. Add slowly the solution of sodium ethylate prepared from 0.04 g (1.73 mmol) of sodium metal and 5 ml of absolute ethanol dropwise to a cold solution of 0.05 g (1.58 mmol) of 2-[(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl] propanedihydrazide **4** in 10 ml of absolute ethanol. Leave the reaction mixture overnight in the refrigerator, then stir at room temperature for 6 hours and filter. Add 5 ml of 1 M acetic acid to the filtrate. Filter the precipitate obtained, wash and recrystallize from the mixture of solvents DMF – EtOH. Yield – 0.22 g (51%). M.p. > 300°C. ^{1}H NMR δ, ppm – 11.60 (s, 1H), 10.26 (br. s, 2H), 8.02 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.60 (ddd, *J* = 8.3, 6.7, 1.4 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.27 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.02 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.97 (dd, *J* = 7.6, 2.7 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H). Anal. Calcd for $C_{14}H_{13}N_3O_3$; C, 61.99; H,4.83; N, 15.49; found: C, 61.89; H, 4.84; N, 13.63.

Conclusions

The new derivatives of 1,3-dicarbonyl 2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one have been obtained using 3-dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one as the alkylating agent. These compounds are a promising scaffold for the synthesis of various heterocyclic systems with quinolone substituents. By the example of condensation with hydrazine hydrate the synthesis of new derivatives of 2-methyl-3-[(5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl) methyl]-1,4-dihydroquinolin-4-ones has been shown. Using the tools of chemoinformatics the novelty of these compounds has been shown, and determination of 2D similarity with structures from the ChemBl 20 database has been conducted.

References

1. *Mugnaini C., Pasquini S., Corelli F. Current Medicinal Chemistry, 2009, Vol.16(14), pp.1746-1767. Cited 41 times. doi: 10.2174/092986709788186156.*
2. *Heeb S., Matthew P. Fletcher, Siri Ram Chhabra, Stephen P. Diggle, Williams P., Miguel Cámara. FEMS Microbiology Reviews, 2011, March 35(2), pp.247-274. Cited 77 times. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00247.x*
3. *Tomé A. M., Filipe A. Drug Safety, 2011, Vol. 34, Issue 6, pp.465-488. Cited 33 times. doi: 10.2165/11587280-000000000-00000.*
4. *Zubkov V. A., Gritsenko I. S., Taran S. G., Podolsky I. N., Kamenetskaya O. L. Zhurnal Organichnoi ta Farmatsevtichnoi Khimii – Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry, 2005, Vol. 3, No.2, pp.23-27.*
5. *Zubkov V. O., Tsapko T. O., Gritsenko I. S., Rushchak N. I. Zhurnal Organichnoi ta Farmatsevtichnoi Khimii – Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry, 2011, Vol. 9, No.4, pp.38-41.*
6. *Eicher T. Hauptmann S. The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses, and Applications, 2-nd Completely Revised and Enlarged Edition. Weinheim: Wiley VCH, 2003, 572 p.*
7. *Bolton E., Wang Y., Thiessen P.A., Bryant S.H., Annual Reports in Computational Chemistry, 2008, Vol. 4, pp.217-240.*
8. *Bento A. P., Gaulton A., Hersey A., Bellis L. J., Chambers J., Davies M., Kruger F. A., Light Y., Mak L., McGlinchey S., Nowotka M., Papadatos G., Santos R., Overington J. P. Nucleic Acids Research, 2014, Vol. 42, pp.1083-1090. Cited 54 times. doi: 10.1093/nar/gkt1031.*
9. *Roth, Dana L. Journal of Chemical information and Modeling, 2005, Vol. 45(5), pp.1470-1473. Cited 5 times. doi:10.1021/ci050274b.*
10. *El-Sabbagh O. I. El-Sadek M. E. Lashine S. M. Yassin S. H. El-Nabtity S. M. Medicinal Chemistry Research, 2009, Vol. 18, pp.782-797. Cited 12 times. doi: 10.1007/s00044-009-9203-y.*
11. *Zhongwen Wang, Jun Ren, Zhengming Li, Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry, 2000, Vol. 30, Issue 4, pp.763-769. Cited 6 times. doi: 10.1080/00397910008087378.*
12. *Saoud A. M. Metwally, Maisa I. Abdel Moneim, Yasser A. Elossely, Radwa I. Awad, Khaled Abou-Hadeed. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2010, Vol. 46, Issue 4, pp.426-437. Cited 3 times. doi: 10.1007/s10593-010-0527-9.*

Надійшла до редакції 30.01.2015 р.

УДК 547.771 + 547.789 + 615.012.1:547.79

СИНТЕЗ ТА ГІПОГЛІКЕМІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ 4-ПІРАЗОЛІДЕН-3-КАРБОНОВИХ КИСЛОТ, ЕКЗОФУНКЦІОНАЛІЗОВАНИХ ГІДРАЗИНІЛІДЕН-1,3-ТІАЗОЛІДИНОВИМ ФРАГМЕНТОМ

М.К.Братенко, М.М.Барус, О.М.Денисенко*, Р.В.Родік, М.В.Вовк*, О.К.Ярош**

Буковинський державний медичний університет
58000, м. Чернівці, пл. Театральна, 2. E-mail: bratenko@gmail.com
* Інститут органічної хімії НАН України
** ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

Ключові слова: 4-формілпіразол-3-карбонові кислоти; тіосемікарбазони; діетилацетилендикарбоксилат; 1,3-тіазолідин-4-они; циклоконденсація; гіпоглікемічна активність

Показано, що 4-формілпіразол-3-карбонові кислоти та їх етилові естери селективно взаємодіють із тіосемікарбазидом і його N4-арилпохідними в киплячій оцтовій кислоті з утворенням і виходами 76-91% відповідних 4-піразоліл-тіосемікарбазонів. Знайдено, що 3-годинне нагрівання останніх із діетилацетилендикарбоксилатом у киплячому етанолі приводить до 1,3-тіазолідиновмісних поліфункціональних похідних піразолу з виходами 73-95%. Утворення такого типу сполук є свідченням того, що процес реалізується за схемою первинної атаки нуклеофільного атома сірки тіосемікарбазонного фрагмента на високоелектрофільний потрійний зв'язок ацетилендикарбоксилату із подальшою внутрішньомолекулярною конденсацією, яка приводить до формування 4-оксо-1,3-тіазолідин-5-ілідинового циклу. Структура отриманих 1,3-тіазолідиніліденгідразонопіразолів доведена комплексом спектральних методів, найінформативнішими з яких є спектри ЯМР ^{13}C із сигналами атомів вуглецю тіазолідинового циклу: C^4 (159-161 м.ч.), C^2 (162-165 м.ч.), C^5 (163-165 м.ч.), а також екзоциклічного етоксикарбонілетиліденового фрагмента: HC= (114-118 м.ч.) та C(O)O (165 м.ч.). Встановлено, що синтезовані сполуки викликають гіпоглікемічний дозозалежний ефект у мишей, який суттєво перевищує цукрознижувальну дію референтного препарату піоглітазону.

SYNTHESIS AND THE HYPOGLYCEMIC ACTIVITY OF PYRAZOLIDENE-3-CARBOXYLIC ACIDS AND THEIR DERIVATIVES EXO-FUNCTIONALIZED WITH THE HYDRAZINILIDENE-1,3-THIAZOLIDINE FRAGMENT
M.K.Bratenko, M.M.Barus, O.M.Denisenko, R.V.Rodik, M.V.Vovk, O.K.Yarosh
Key words: *4-formylpyrazole-3-carboxylic acids; thiosemicarbazones; diethylacetylenedicarboxylate; 1,3-thiazolidine-4-ones; cyclocondensation; hypoglycemic activity*
It has been shown that 4- formylpyrazole-3-carboxylic acids and their ethyl esters interact selectively with thiosemicarbazide and its N4-aryl-derivatives in boiling acetic acid with formation of the corresponding 4-pyrazolylthiosemicarbazones with the yields of 76-91%. It has been found that heating of 4-pyrazolylthiosemicarbazones with diethyl acetylenedicarboxylate in boiling ethanol for 3 hours leads to formation of 1,3-thiazolidine-containing polyfunctional pyrazole derivatives with yields of 73-95%. Formation of compounds of this type indicates that the process occurs according to the scheme of the primary attack of a highly electrophilic triple bond of acetylenedicarboxylate by the nucleophilic atom of sulfur of the thiosemicarbazone fragment with subsequent intramolecular condensation, which leads to formation of the 4-oxo-1,3-thiazolidine-5-ilidene cycle. The structure of the 1,3-thiazolidinilidenehydrazonepyrazoles synthesized has been proven by a complex of spectral methods; the most informative of them are ^{13}C NMR spectra with signals of carbon atoms of the thiazolidine cycle: C^4 (159-161 ppm), C^2 (162-165 ppm), C^5 (163-165 ppm), as well as of the exo-cyclic ethoxycarbonylethylidene fragment: HC= (114-118 ppm); and of C(O) O (165 ppm). It has been determined that the compounds synthesized cause the hypoglycemic dose-dependent effect in mice, which is much more potent than the same effect of the reference medicine – pioglitazone.

СИНТЕЗ И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 4-ПИРАЗОЛИДЕН-3-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ, ЭКЗОФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ ГИДРАЗИНИЛИДЕН-1,3-ТИАЗОЛИДИНОВЫМ ФРАГМЕНТОМ
М.К.Братенко, М.М.Барус, О.Н.Денисенко, Р.В.Родик, М.В.Вовк, А.К.Ярош
Ключевые слова: *4-формилпиразол-3-карбоновые кислоты; тиосемикарбазоны; диэтилацетилендикарбоксилат; 1,3-тиазолидин-4-оны; циклоконденсация; гипогликемическая активность*
Показано, что 4-формилпиразол-3-карбоновые кислоты и их этиловые эфиры селективно взаимодействуют с тиосемикарбазидом и его N4-арилпроизводными в кипящей уксусной кислоте с образованием и выходами 76-91% соответствующих 4-пиразолилтиосемкарбазонов. Найдено, что 3-часовое нагревание последних с диэтилацетилендикарбоксилатом в кипящем этаноле приводит к 1,3-тиазолидинсодержащим полифункциональным производным пиразола с выходами 73-95%. Образование такого типа соединений свидетельствует о том, что процесс реализуется по схеме первичной атаки нуклеофильного атома серы тиосемикарбазонного фрагмента на высокоэлектрофильную тройную связь ацетилендикарбоксилата с последующей внутримолекулярной конденсацией, которая приводит к формированию 4-оксо-1,3-тиазолидин-5-илиденового цикла. Структура полученных 1,3-тиазолидинилиденгидразонопиразолов установлена комплексом спектральных методов, наиболее информативными из которых являются спектры ЯМР ^{13}C с сигналами атомов углерода тиазолидинового цикла: C^4 (159-161 м.ч.), C^2 (162-165 м.ч.), C^5 (163-165 м.ч.), а также экзоциклического этоксикарбонилэтилиденового фрагмента: HC= (114-118 м.ч.) и C(O)O (165 м.ч.). Установлено, что синтезированные соединения вызывают гипогликемический дозозависимый эффект у мышей, который существенно превышает сахароснижающее действие референтного препарата пиоглитазона.

Цукровий діабет 2 типу (ЦД-2) належить до однієї з найпоширеніших і водночас дуже небезпечних хвороб людства [1-2]. Хоча на теперішній час причина виникнення цього захворювання до кінця не встановлена, однією з її складових є розвиток наростаючого енергодефіциту («гіпоенергетичного синдрому») в життєво важливих органах, у першу чергу, в центральній нервовій системі, а в подальшому і в периферійних тканинах. Саме це призводить до загибелі клітин і розвитку інфарктів, інсультів, нейро- та нефропатій, відмирання кінцівок внаслідок сухої гангрени тощо [3-5].

Для лікування ЦД-2 зазвичай використовують пероральні синтетичні препарати різноманітної будови, які викликають блокування всмоктування глюкози в шлунково-кишковому тракті (ШКТ), стимуляцію продукції додаткового пулу інсуліну (секретагоги) або підвищення чутливості тканин до інсуліну (сенситайзери). Серед останніх значного поширення набула група тіазолідиндіонів або глітазонів, типовими представниками яких є троглітазон [6], розиглітазон [7] та піоглітазон [8]. В той же час вказані препарати відзначаються низкою побічних ефектів, серед яких небажаними є висока токсичність для гепатоцитів та збільшення кількості розвитку інфарктів міокарда.

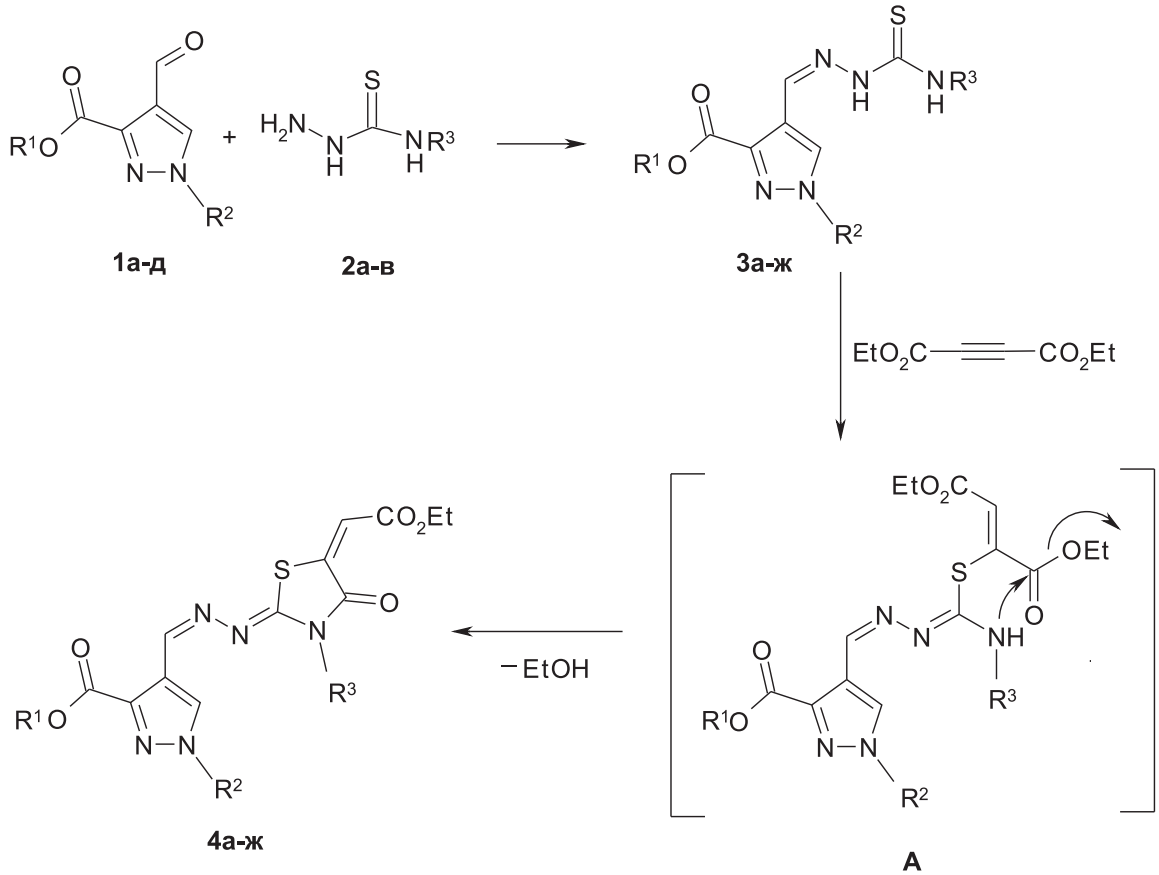
Виходячи з цього актуальним завданням сучасної медичної хімії є розширення арсеналу за рахунок пошуку нових ефективних і безпечних протидіабетичних (гіпоглікемічних) засобів для терапії ЦД-2. Перспективним варіантом дизайну таких препаратів видається хімічна модифікація тіазолідинового циклу такими потужними фармакофорами, як функціоналізовані піразольні системи. Попередні дослідження такого типу сполук показали, що вони відіграють важливу роль в сучасних методологіях створення лікарських засобів, оскільки відзначаються вираженим біологічним потенціалом [9-12]. У цьому контексті важливо відзначити, що деякі похідні піразолу [13, 14], в тому числі і гібридні сполуки з тіазолідиновим циклом [15], зарекомендували себе як антигіперглікемічні агенти. Саме тому синтез біциклічних структур із піразольним та тіазолідиновим фрагментами в рамках одного молекулярного каркасу є важливим у ключі пошуку нових гіпоглікемічних препаратів.

Базовими об'єктами для вирішення поставленої задачі були обрані раніше синтезовані нами [16] препаративно доступні 4-формілпіразол-3-карбонові кислоти **1а-б** та відповідні етилові естери **1в-д**. Наявність в їх структурі альдегідної групи створює необхідні передумови для її модифікації тіосемікарбазидними фрагментами з метою використання отриманих продуктів для подальших гетероциклізацій. Установлено, що сполуки **1а-д** селективно взаємодіють із тіосемікарбазидом **2а** та його N4-арилпохідними **2б,в** у киплячій оцтовій кислоті з утворенням із виходами 76-91% 4-піразоліл-тіосемікарбазонів **3а-ж**, структура яких підтверджена спектральними вимірами.

Відомо, що тіосемікарбазони є ефективними синтетичними блоками для побудови різноманітних типів гетероциклічних систем [17]. Зокрема, на їх взаємодії з α-галогенокарбонільними сполуками базується синтез поліфункціональних тіазолів [18-20]. В останній час у ролі важливих 1,2-біелектрофільних реагентів для гетероциклізацій знайшли застосування естери ацетилендикарбонової кислоти [21]. При цьому наявна в літературі інформація стосовно їх реакції із тіосемікарбазонами є неоднозначною. Так, згідно з повідомленням авторів [22] 4-фенілтіосемікарбазиди арилальдегідів реагують із диметилацетилендикарбоксилатом з утворенням похідних 3-піразоліл-1-(фенілтіокарбамоїл)піразолу, натомість у роботі [23] наводяться дані рентгеноструктурного аналізу, згідно з якими продуктами аналогічної реакції з діетилацетилендикарбоксилатом є похідні тіазолідин-4-ону.

Нами показано, що нагрівання протягом 3 год 4-піразоліл-тіосемікарбазонів **3а-ж** із діетилацетилендикарбоксилатом у киплячому етанолі приводить до 1,3-тіазолідиновмісних поліфункціональних похідних піразолу **4а-ж** з виходами 73-95%. Утворення такого типу сполук є свідченням того, що як і у випадку 4-арилтіосемікарбазонів [23] процес реалізується за схемою первинної атаки нуклеофільного атома сірки тіосемікарбазонного фрагмента на високоелектрофільний потрійний зв'язок із утворенням інтермедіатів типу **А**, внутрішньомолекулярна конденсація яких приводить до формування 4-оксо-1,3-тіазолідин-5-іліденового циклу.

Похідні 1,3-тіазолідиніліденгідразонопіразолів **4а-ж** (табл. 1, 2) – безбарвні високоплавкі речовини, будова яких доведена комплексом спектральних методів. Їх ІЧ-спектри характеризуються середньо- та сильноінтенсивними смугами поглинання зв'язків C=N (1620-1635 $см^{-1}$) та C=O (1700-1705, 1730-1735 $см^{-1}$), а для сполук **4а,б,д,е** також і зв'язків N-H (3275-3285 $см^{-1}$). В спектрах ЯМР ^1H наявні типові сигнали протонів екзоциклічних іліденового (6.60-6.79 м.ч.) та гідразонного (8.62-8.99 м.ч.) фрагментів. Не менш доказовим фактом запропонованої структури отриманих сполук є спектри ЯМР ^{13}C (табл. 3) із сигналами атомів вуглецю тіазолідинового циклу: C^4 (159-161 м.ч.), C^2 (162-165 м.ч.), C^5 (163-165 м.ч.), а також екзоциклічного етоксикарбоніл-етиліденового фрагмента: HC= (114-118 м.ч.) та C(O)O (165 м.ч.), що узгоджується із результатами роботи [23] і виключає можливість утворення альтернативних 3-піразоліл-1-(арилтіокарбамоїл)піразолів [22].



1, R^1=H, R^2=Ph (а), 4-MeC_6H_4 (б); R^1=Et, R^2=Me (в), Ph (г),4-MeC_6H_4 (д); **2**, R^3=H (а), 4-$F_2CHC_6H_4$ (б), 3-$MeOC_6H_4$ (в);
3, 4, R^1=R^3=H, R^2=Ph (а), 4-MeC_6H_4 (б); R^1=H, R^2=Ph, R^3=4-$F_2CHC_6H_4$ (в); R^2=4-MeC_6H_4, R^3=3-$MeOC_6H_4$ (г);
R^1=Et, R^3=H: R^2=Ph (д), 4-MeC_6H_4 (е); R^1=Et, R^2=Me, R^3=4-$F_2HCC_6H_4$ (є); R^1=Et, R^2=4-MeC_6H_4, R^3=3-$MeOC_6H_4$ (ж).

Схема 1

Таблиця 1

Виходи, температури плавлення, мас-спектри та результати елементного аналізу синтезованих сполук **3а-ж**, **4а-ж**

Сполука	Вихід, %	Т. пл., °С	$[M+1]^+$	Знайдено, %			Формула	Вирахувано, %		
				C	H	N		C	H	N
3а	81	258-260	290	50.01	4.00	23.98	$C_{12}H_{11}N_5O_2S$	49.82	3.83	24.21
3б	76	303-305	304	51.22	4.18	22.85	$C_{13}H_{13}N_5O_2S$	51.47	4.32	23.09
3в	79	238-240	432	53.11	3.43	16.46	$C_{19}H_{15}F_2N_5O_3S$	52.90	3.50	16.23
3г	96	253-255	410	58.97	4.57	16.89	$C_{20}H_{19}N_5O_3S$	58.67	4.68	17.10
3д	84	223-225	318	53.12	4.66	22.30	$C_{14}H_{15}N_5O_2S$	52.98	4.76	22.07
3е	91	248-250	332	54.65	5.08	21.26	$C_{15}H_{17}N_5O_2S$	54.37	5.17	21.13
3є	78	188-190	398	48.62	4.40	17.47	$C_{16}H_{17}F_2N_5O_3S$	48.36	4.31	17.62
3ж	89	210-212	438	60.68	5.40	15.89	$C_{22}H_{23}N_5O_3S$	60.40	5.30	16.01
4а	87	278-280	414	52.04	3.70	17.05	$C_{18}H_{15}N_5O_5S$	52.30	3.66	16.94
4б	78	298-300	428	53.08	4.01	16.51	$C_{19}H_{17}N_5O_5S$	53.39	4.01	16.38
4в	73	248-250	556	53.90	3.37	12.80	$C_{25}H_{19}F_2N_5O_6S$	54.05	3.45	12.61
4г	85	213-215	534	58.73	4.45	12.93	$C_{26}H_{23}N_5O_6S$	58.53	4.34	13.13
4д	89	200-202	442	54.67	4.55	16.01	$C_{20}H_{19}N_5O_5S$	54.41	4.34	15.86
4е	95	210-212	456	55.09	4.53	15.52	$C_{21}H_{21}N_5O_5S$	55.38	4.65	15.38
4є	88	138-140	522	50.37	3.96	13.65	$C_{22}H_{21}F_2N_5O_6S$	50.67	4.06	13.43
4ж	75	183-185	562	60.05	4.90	12.26	$C_{28}H_{27}N_5O_6S$	59.88	4.85	12.47

Таблиця 2

ІЧ- та ЯМР ^{1}H спектри сполук **3а-ж**, **4а-ж**

Сполука	ІЧ-спектр, KBr, ν, см$^{-1}$				Спектри ЯМР ^{1}H, δ, м.ч.
	C=O	N-H	C=N	COOH	
3а	1695	3275-3310	–	2596-2910	7.40 т (1H$_{аром.}$, *J* 7.2 Гц), 7.56 т (2H$_{аром.}$, *J* 7.6 Гц), 7.85 д (2H$_{аром.}$, *J* 7.6 Гц), 7.95 с (1H, NH), 8.29 с (1H, NH), 8.46 с (1H, H$^5_{піразол}$), 9.24 с (1H, HC=N), 11.53 с (1H, NH)
3б	1700	3280-3320	–	2560-2830	2.33 с (3H, CH_3), 7.34 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.4 Гц), 7.74 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.4 Гц), 7.95 с (1H, NH), 8.29 с (1H, NH), 8.46 с (1H, H$^5_{піразол}$), 9.16 с (1H, HC=N), 11.52 с (1H, NH).
3в	1700	–	–	2520-2850	7.19 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.4 Гц), 7.23 т (1H, CHF_2, J_{H-F} 75.2 Гц), 7.43-7.59 м (5H$_{аром.}$), 7.85 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.4 Гц), 8.61 с (1H, H$^5_{піразол}$), 9.24 с (1H, HC=N), 9.98 с (1H, NH), 11.99 с (1H, NH)
3г	1695	3295-3315	–	2510-2840	2.35 с (3H, CH_3), 3.75 с (3H, CH_3O), 6.78 д (1H$_{аром.}$, *J* 7.2 Гц), 7.15-7.19 м (1H$_{аром.}$), 7.28 т (2H$_{аром.}$, *J* 7.6 Гц), 7.36 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.0 Гц), 7.74 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.0 Гц), 8.60 с (1H, H$^5_{піразол}$), 9.22 с (1H, HC=N), 9.91 с (1H, NH), 11.94 с (1H, NH)
3д	1730	3290-3350	–	–	1.35 т (3H, CH_3, *J* 7.2 Гц), 4.33 к (2H, CH_2, *J* 7.2 Гц), 7.43 т (1H$_{аром.}$, *J* 7.2 Гц), 7.57 т (2H$_{аром.}$, *J* 7.6 Гц), 7.85 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.4 Гц), 7.96 с (1H, NH), 8.32 с (1H, NH), 8.42 с (1H, H$^5_{піразол}$), 9.24 с (1H, HC=N), 11.61 с (1H, NH)
3е	1725	3280-3340	–	–	1.34 т (3H, CH_3, *J* 7.2 Гц), 4.33 к (2H, CH_2, *J* 7.2 Гц), 7.35 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.0 Гц), 7.73 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.0 Гц), 7.96 с (1H, NH), 8.30 с (1H, NH), 8.42 с (1H, NH), 8.42 с (1H, H$^5_{піразол}$), 9.19 с (1H, HC=N), 11.54 с (1H, NH)
3є	1730	3300-3350	–	–	1.31 т (3H, CH_3, *J* 7.2 Гц), 3.92 с (3H, CH_3N), 4.28 к (2H, CH_2, *J* 7.2 Гц), 7.16 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.4 Гц), 7.22 т (1H, CHF_2, J_{C-F} 74.4 Гц), 7.54-7.59 м (2H$_{аром.}$), 8.49 с (1H, H$^5_{піразол}$), 8.56 с (1H, HC=N), 9.97 с (1H, NH), 11.94 с (1H, NH)
3ж	1730	3295-3240	–	–	1.36 т (3H, CH_3, *J* 7.2 Гц), 2.35 с (3H, CH_3), 3.75 с (3H, CH_3O), 6.79 д (1H$_{аром.}$, *J* 8.0 Гц), 7.14-7.19 м (1H$_{аром.}$), 7.27 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.0 Гц), 7.36 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.0 Гц), 7.74 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.0 Гц), 8.56 с (1H, H$^5_{піразол}$), 9.25 с (1H, HC=N), 9.92 с (1H, NH), 12.04 с (1H, NH)
4а	1705, 1730	3280	1630	2510-2840	1.26 т (3H, CH_3, *J* 7.0 Гц), 4.24 к (2H, CH_2, *J* 7.0 Гц), 6.64 с (1H, HC=C), 7.44-7.58 м (3H$_{аром.}$), 8.02 д (2H$_{аром.}$, *J* 7.8 Гц), 8.92 с(1H, HC=N), 13.02 ш.с. (2H, COOH+NH)
4б	1700, 1730	3275	1635	2515-2830	1.25 т (3H, CH_3, *J* 6.8 Гц), 2.37 с (3H, CH_3), 4.23 к (2H, CH_2, *J* 6.8 Гц), 6.64 с (1H, HC=C), 7.35 д (2H$_{аром.}$, *J* 7.6 Гц), 7.89 д (2H$_{аром.}$, *J* 7.6 Гц), 8.86 с (1H, H$^5_{піразол}$), 8.96 с (1H, HC=N), 12.84 ш.с. (1H, NH), 13.45 ш.с. (1H, COOH)
4в	1700, 1730	–	1635	2515-2850	1.27 т (3H, CH_3, *J* 6.8 Гц), 4.27 к (2H, CH_2, *J* 6.8 Гц), 6.79 с (1H, HC=C), 7.17-7.58 м (8H, 7H$_{аром.}$+HCF_2), 8.00 д (2H$_{аром.}$, *J* 7.8 Гц), 8.72 с (1H, H$^5_{піразол}$), 9.03 с (1H, HC=N), 13.54 ш.с. (1H, COOH)
4г	1705, 1730	–	1630	2230-2860	1.28 т (3H, CH_3, *J* 7.0 Гц), 2.36 с (3H, CH_3), 3.79 с (3H, CH_3O), 4.29 к (2H, CH_2, *J* 7.0 Гц), 6.78 с (1H, HC=C), 7.07-7.54 м (6H$_{аром.}$), 7.89 д (2H$_{аром.}$, *J* 7.4 Гц), 8.71 с (1H, H$^5_{піразол}$), 8.99 с (1H, HC=N), 13.47 ш.с. (1H, COOH)
4д	1700, 1730	3285	1620	–	1.25 т (3H, CH_3, *J* 7.2 Гц), 1.34 т (3H, CH_3, *J* 6.8 Гц), 4.20 к (2H, CH_2, *J* 7.2 Гц), 4.38 к (2H, CH_2, *J* 6.8 Гц), 6.62 с (1H, HC=C), 7.44-7.58 м (3H$_{аром.}$), 7.99 д (2H$_{аром.}$, *J* 7.6 Гц), 8.81 с (1H, H$^5_{піразол}$), 8.99 с (1H, HC=N), 12.82 с (1H, NH)
4е	1700, 1735	3280	1620	–	1.26 т (3H, CH_3, *J* 7.2 Гц), 1.34 т (3H, CH_3, *J* 7.0 Гц), 2.36 с (3H, CH_3), 4.22 к (2H, CH_2, *J* 7.2 Гц), 4.37 к (2H, CH_2, *J* 7.0 Гц), 6.60 с (1H, HC=C), 7.34 д (2H$_{аром.}$, *J* 7.6 Гц), 7.83 д (2H$_{аром.}$, *J* 7.6 Гц), 8.78 с (1H, H$^5_{піразол}$), 8.87 с (1H, HC=N), 12.76 с (1H, NH)
4є	1705, 1730	–	1625	–	1.25-1.30 м (6H, 2CH_3), 3.97 с (3H, CH_3), 4.23-4.28 м (4H, CH_2), 6.78 с (1H, HC=C), 7.21-7.61 м (5H, 4H$_{аром.}$+CHF_2), 8.43 с (1H, H$^5_{піразол}$), 8.62 с (1H, HC=N)
4ж	1705, 1735	–	1630	–	1.28-1.32 м (6H, 2CH_3), 2.38 с (3H, CH_3), 4.29 к (2H, CH_2, *J* 7.0 Гц), 4.33 к (2H, CH_2, *J* 6.8 Гц), 6.78 с (1H, HC=C), 7.06-7.14 м (3H$_{аром.}$), 7.35-7.48 м (3H$_{аром.}$), 7.89 д (2H$_{аром.}$, *J* 8.0 Гц), 8.68 с (1H, H$^5_{піразол}$), 9.01 с (1H, HC=N).

Результати дослідження гіпоглікемічної дії синтезованих сполук наведені у табл. 4 і показують, що вони здатні впливати на вуглеводний обмін, про що свідчать показники вмісту глюкози в крові на різних етапах після введення речовин. Практично всі сполуки знижували концентрацію глюкози, але з різною силою. Із тестованих речовин найбільшою активністю відзначалися сполуки **4б** та **4є**, які суттєво перевищували референтний препарат піоглітазон (табл. 4, 5). Гіпоглікемічна активність обох сполук була між собою достатньо близькою за показниками, оскільки вони є спорідненими структурами, хоча у вигляді, відповідно, карбонової кислоти та етилового естеру.

В той же час між вказаними сполуками також спостерігалася різниця в активності – більшу ефек-

Таблиця 3

Спектри ЯМР ^{13}C сполук **4а**, **в**, **г**, **д**, **є**

Сполука	δ, м.ч.													
	H_3C	H_2CO	HC=	R^2	C^5 піразол	C^3 піразол	R^3	C^4 піразол	C(O)OR^1	HC=N	C^4 тіазол	C^2 тіазол	C^5 тіазол	C(O)OEt
4а	14.27	61.31	114.27	120.08, 127.16, 129.47, 138.05	142.91	143.39	-	120.08	151.64	152.67	161.47	162.84	163.82	165.41
4в	15.0	61.41	116.21	110.68, 127.42, 129.92, 138.38	141.57	143.45	115.16, 118.34, 119.02, 130.80, 143.45	120.22	151.08	152.68	159.88	162.81	164.07	165.43
4г	13.64	61.44	114.49	20.24, 119.76, 124.62, 129.72, 134.69	141.74	143.24	58.09, 113.76, 118.17, 127.02, 128.97, 141.17, 159.04	119.73	151.32	152.72	159.63	162.80	164.07	165.53
4д	13.95 14.09	61.02 61.24	114.40	119.58, 127.81, 129.31, 138.51	142.36	142.81	-	121.38	151.45	152.73	161.31	163.15	165.38	165.35
4є	13.87 13.94	60.63 61.41	118.83	116.13, 117.08, 118.83, 129.80, 140.78	141.07	141.59	-	120.80	151.05	152.54	159.79	164.07	164.07	165.30

тивність зниження цукру реєстрували під впливом естеру **4є**. Також проглядалась різниця у швидкості настання дії: сполука **4б** повільніше викликала зниження вмісту глюкози в крові, але її ефект утримувався довше, ніж у сполуки **4є**. Такий факт підтверджується збереженням гіпоглікемічної дії навіть через добу після введення кислоти **4б**. В цих умовах вміст глюкози визначався на рівні від –14,4% до –18,7%, а після введення естеру **4є** – від 0 до +8,1% у порівнянні з вихідним станом. В той же час естер **4є** ініціював зниження концентрації глюкози в крові дещо пізніше, але його гіпоглікемічний ефект був сильнішим та коротшим за терміном впливу на вуглеводний обмін і утримання ефекту гіпоглікемії.

Таким чином, синтезовані нові похідні тіазолідинонів, особливо сполуки **4б** та **4є,** після їх ретельного доклінічного вивчення та дослідження токсичних властивостей і безпечності можуть стати претендентами для створення нових гіпоглікемічних засобів.

Експериментальна хімічна частина

ІЧ-спектри синтезованих сполук записані на спектрофотометрі UR-20 в табл. KBr. Спектри ЯМР ^1H зареєстровані на спектрофотометрі Varian-Gemini (300 МГц) в розчині ДМСО-d_6, внутрішній стандарт – тетраметилсилан. Хроматомас-спектри отримані на приладі PE SCIEX API 150 EX [детектори UV (254 нм) та ELSD].

4-{[(Амінокарбонотіоїл)гідразоно]метил}-1*H*-піразол-3-карбонові кислоти (3а-г) та їх етилові естери (3д-ж). Суміш 0,01 Моль альдегіду **1а-д** та тіосемікарбазиду **2а-в** в 10 мл крижаної оцтової кислоти кип'ятили впродовж 30 хв. Розчинник відганяли до половини початкового об'єму, осад відфільтровували, промивали холодним етанолом і кристалізували з етанолу.

4-{2-[(2-Етокси-2-оксоетиліден)-4-оксо-1,5-тіазолідин-2-іліден]-гідразоно}метил-1Н-піразол-3-карбонові кислоти (4а-г) та їх етилові естери (4д-ж). До розчину 0,002 Моль тіосемікарбазону **(3а-ж)** в 15 мл етанолу додавали 0,34 г (0,002 Моль) діетилацетилендикарбоксилату і кип'ятили впродовж 3 год. Реакційну суміш охолоджували, утворений осад відфільтровували і кристалізували з етанолу.

Експериментальна біомедична частина

Гіпоглікемічну активність отриманих сполук досліджували на білих безпородних мишах обох статей масою 20-30 г. Тварин розділяли на 3 групи: 1) контрольна, в якій перорально зондом вводили розчинник: 0,1 мл диметилсульфоксиду +

Таблиця 4

Динаміка змін рівня глюкози в крові мишей у різні періоди після перорального введення досліджуваних речовин (**4а-4ж**)

Сполука	Доза, мМ/кг	Час після введення речовин, год					
		В.р.	1	3	5	8	24
Контроль	0,3 мл	7,4±0,2	7,3±0,3	6,6±0,2	6,9±0,3	6,9±0,3	7,3±0,2
Піоглітазон	0,002805	7,2±0,5	6,9±0,4	6,3*±0,3	6,5*±0,3	6,5*±0,3	7,4±0,3
	0,02805	6,5±0,4	6,2±0,4	5,2*±0,3	5,7*±0,5	5,8*±0,4	7,0±0,3
	0,02805	7,1±0,5	6,6±0,4	5,7*±0,4	5,1*±0,3	6,1*±0,4	7,0±0,5
4 а	0,002419	8,1±0,6	7,1±0,5	6,6±0,5	6,2±0,5	5,3*±0,4	7,4±0,5
	0,02419	9,6±0,5	7,2*±0,4	7,4*±0,5	7,2*±0,5	7,0*±0,4	8,9±0,6
	0,2419	8,1±0,6	5,8*±0,4	3,5**±0,3	4,5**±0,3	3,5**±0,3	7,8±0,5
4 б	0,002342	9,0±0,6	7,9±0,6	7,4±0,5	5,2**±0,3	6,5**±0,3	7,7±0,5
	0,002342	8,0±0,6	7,2±0,5	5,3*±0,3	5,2**±0,3	4,7**±0,3	6,8±0,5
	0,002342	8,0±0,7	6,0±0,5	5,4*±0,4	3,3**±0,3	3,5**±0,3	6,5±0,4
4 в	0,001749	6,9±0,5	6,8±0,6	5,7±0,5	6,9±0,4	6,0±0,4	7,0±0,4
	0,01749	8,4±0,6	7,3±0,5	5,4*±0,4	6,5*±0,4	6,0*±0,4	8,0±0,4
	0,01749	7,4±0,5	6,6±0,5	5,4*±0,4	4,5**±0,4	4,2**±0,3	6,1±0,5
4 г	0,0022265	6,7±0,5	6,5±0,5	6,0±0,5	6,0±0,4	4,1**±0,4	7,3±0,5
	0,022265	7,8±0,6	6,4±0,5	6,4*±0,4	7,6±0,5	6,1*±0,5	7,5±0,5
	0,22265	8,5±0,5	7,5±0,5	5,4*±0,4	7,2±0,5	5,8*±0,4	8,4±0,5
4 д	0,002491	8,3±0,6	6,7±0,5	6,9*±0,4	6,4*±0,4	6,6*±0,3	7,8±0,4
	0,02491	7,4±0,5	5,4*±0,4	5,5*±0,4	5,8*±0,5	6,4±0,5	8,0±0,5
	0,2491	7,5±0,5	5,9*±0,4	5,9*±0,4	5,2*±0,5	5,8±0,5	7,5±0,5
4 е	0,001860	8,2±0,6	6,7±0,5	5,1*±0,4	4,8*±0,3	4,5*±0,3	8,0±0,5
	0,01860	6,9±0,5	7,2±0,6	5,4*±0,4	7,2±0,6	6,3±0,5	6,9±0,5
	0,1860	7,3±0,6	7,1±0,6	6,0±0,5	4,5**±0,4	3,8**±0,3	3,5*±0,3
4 є	0,002121	8,5±0,6	6,8±0,5	5,7*±0,4	5,8*±0,4	7,0±0,5	6,6±0,5
	0,02121	7,7±0,6	6,3±0,5	4,1**±0,3	3,3**±0,3	3,5**±0,3	6,1±0,5
	0,2121	7,4±0,5	5,8*±0,4	3,6*±0,3	3,0**±0,3	2,7**±0,2	6,6±0,5
4 ж	0,001731	9,2±0,6	7,8±0,5	6,9*±0,4	6,4*±0,4	7,0*±0,4	8,7±0,5
	0,01731	8,0±0,5	6,3*±0,4	6,2*±0,4	6,1*±0,4	6,2*±0,3	7,9±0,5
	0,1731	8,9±0,6	7,3±0,5	6,2*±0,4	6,3*±0,4	5,5*±0,3	8,4±0,5

Примітки: В.р. (вихідний рівень); * – P<0,05 відносно вихідного рівня; ** – P<0,05 відносно піоглітазону.

Таблиця 5

Порівняльна динаміка змін рівня глюкози (в %) в крові мишей у різні періоди після перорального введення досліджуваних речовин

Сполука	Доза, мМ/кг	Час після введення речовин, год					
		В.р.	1	3	5	8	24
Контроль	0,3 мл	100%	-1,3	-10,8	-6,7	-6,7	-1,3
Піоглітазон	0,002805	100%	-4,2	-12,5	-9,7	-9,7	2,8
	0,02805	-“-	-4,6	-20,0	-12,3	-10,8	7,7
	0,02805	-“-	-7,0	-19,7	-28,2	-14,1	1,4
4 б	0,002342	100%	-12,2	-17,8	-42,2	-27,8	-14,4
	0,002342	-“-	-10,0	-33,7	-35,0	-41,2	-15,0
	0,002342	-“-	-25,0	-32,5	-58,7	-55,0	-18,7
4 є	0,002121	100%	-20,0	-32,9	-31,8	-17,6	6,0
	0,02121	-“-	-18,2	-46,7	-57,1	-54,5	8,1
	0,2121	-“-	-21,6	-51,4	-59,5	-63,5	0

0,2 мл 3% крохмального гелю; 2) група мишей, яким вводили препарат порівняння піоглітазон; 3) піддослідна, яка отримувала синтезовану сполуку у вказаному розчиннику.

Первинний скринінг давав можливість відібрати похідні з наявною здатністю впливати на концентрацію глюкози в крові, порівняти їх гіпоглікемічний ефект з дією референтного препарату. Оцінку проводили шляхом порівняння змін концентрації глюкози в крові перед введенням досліджуваних речовин та через 1, 3, 5, 8 та 24 год після цього. Рівень глюкози в капілярній крові з хвоста миші визначали глюкометром BIONIME Rightest GM 110 (Швейцарія), зареєстрованим у МОЗ України за №7674/2008. Сполуки вводили в дозах 0,001731-0,002491, 0,01731-0,02491 та 0,1731-0,2491 мМ/кг для відбору найактивніших з них.

Отримані результати обробляли з визначенням достовірності відмінностей між показниками піддослідних і контрольних тварин та препаратом порівняння ($p \leq 0,05$) з використанням стандартних програм Microsoft Excel [24, 25].

Висновки

1. Розроблено метод синтезу нових 1,3-тіазолідиновмісних поліфункціональних похідних піразолу, який ґрунтується на взаємодії 4-формілпіразол-3-карбонових кислот та їх етилових естерів із тіосемікарбазидом та подальшою циклоконденсацією утворених 4-піразолілтіосемікарбазонів із діетилацетилендикарбоксилатом.

2. Встановлено, що синтезовані сполуки викликають гіпоглікемічний дозозалежний ефект у мишей, який суттєво перевищує цукрознижувальну дію референтного препарату піоглітазону. При цьому найвищу гіпоглікемічну активність проявляють піразол-3-карбонова кислота **4б** та естер **4є**, причому перша з них переважає за тривалістю ефекту, а друга – за активністю.

Література

1. *Eckel R. H., Grundy S. M., Zimmet P. Z. The Lancet, 2005, Vol. 365, pp.1415-1428.*
2. *Khan S. E. Diabetologia, 2003, Vol. 46, No.1, pp.3-19.*
3. *Yarosh O. K. Farmakologiya ta likarska toksykologiya, 2011, No.5(24), pp.390-392.*
4. *Yarosh O. K. Farmakologiya ta likarska toksykologiya, 2011, No.5(24), pp. 393-394.*
5. *Yarosh O. K., Denysenko O. M., Rodik R. V., Kalchenko V. I. Materialy dopovidey naukovoho seminaru. Hurzuf, 2013, pp.15-20.*
6. *Shimabukuro M., Zhou Y. T., Lee Y., Unger R. U. Journal of Biological Chemistry, 1998, Vol. 273, pp.3547-3550.*
7. *Nissen S. E., Wolski K. New England Journal of Medicine, 2007, Vol. 356, pp.2457-2471.*
8. *Lincoff A. M., Wolski K., Nockols S. J., Nissen S. E. Journal of American Medicine, 2007, Vol. 298, pp.1180-1188.*
9. *Guzman-Perez A., Webster R. T., Allen M. C., Broun J. A., Buchholz A. R., Cook E. R., Day W. W., Hamanaka E. S., Kennedy S. P., Knight D. R., Kowalczuk P. J., Marala R. P., Mularski C. J., Novomisle W. A., Ruggeri R. B., Tracy W. R., Hill R. J. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, 2001, Vol. 11, No.6, pp.803-807.*
10. *Roelfan S. G., Arnold C., Wllnga K. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1979, Vol. 84, No.2, pp.406-409.*
11. *Vovk M. V., Bratenko V. O., Chornous V. O. 4-Funktsionalno zamishcheni pirazoly. Chernintsi, 2008, Prut, pp.203-220.*
12. *Perez-Fernandez R., Goya P., Elguero J. Arkivoc, 2014, pp.233-293.*
13. *Gregory R., Greg A., Beverly B., Christine B., Bork B., Bryan F. B., Michele E. G., Jiaping D. Journal of Medicinal Chemistry, 2001, Vol. 44, No.16, pp.2601-2616.*
14. *Hernandez-Varguez E., Agoayo-Ortis R., Ramirez-Espinoza J. J., Estrada-Soto S., Hernandes-Luis F. Europien Journal of Medicinal Chemistry, 2013, Vol. 69, No.1, pp.10-21.*
15. *Bhosle M. R., Mali J. R., Pal S., Srivastava A. K., Mane R. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2014, Vol. 24, No.12, pp.2651-2654.*
16. *Bratenko M. K., Barus M. M., Vovk M. V. Khimiya heterotsiklicheskikh soedinenii – Chemistry of heterocyclic compounds, 2009, No.12, pp.1817-1822.*
17. *Hassan A. A., Shawky A. M., Shehata H. S. Journal of Heterocyclic Chemistry, 2012, Vol. 49, No.1, pp.21-37.*
18. *Holla B. S., Malini K. V., Rao B. S., Sarojini B. K., Kumari N. S. Europien Journal of Medicinal Chemistry, 2003, Vol. 38, No.3, pp.3313-3318.*
19. *Hildegard J., Seifert K., Johne S., Bluka E. Pharmazie, 1978, Vol. 33, No.2, pp.259-265.*
20. *Cukovali A., Yilmaz I., Gur S., Kazaz C. Europien Journal of Medicinal Chemistry, 2006, Vol. 41, No.2, pp.201-207.*
21. *Neokhoritis C. G., Zagdanes-Tzitzikas T., Stefaniodu-Stefonotou J. Synthesis, 2014, No.5. pp.537-585.*
22. *Hassan A. A., Shehata H. S., Dopp D. Journal of Chemical Research, 2008, No.12, pp.725-730.*
23. *Benmohammed A., Khoumeri O., Diafri A., Terme T., Vanelle P. Molecules, 2014, Vol. 19, pp.3068-3083.*
24. *Montsevichute-Eringene E. V. Patologicheskaya phiziologiya, 1964, No.4, s. 71-78.*
25. *Doklinichni doslidzhennya likarskykh zasobiv. Metodychni rekomendatsii. Red. O. V.Stefanov. Kyiv, 2001, 527 s.*

Надійшла до редакції 15.01.2015 р.

UDC 615.212:542.951.1:547.831.7:547.831.9

SYNTHESIS AND THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF 4-HYDROXY-2,2-DIOXO-1H-2λ^6,1-BENZOTHIAZIN-3-CARBOXYLIC ACIDS TRIFLUOROMETHYL-SUBSTITUTED ANILIDES

L.A.Petrushova, I.V.Ukrainets, S.P.Dzyubenko*, L.A.Grinevich

National University of Pharmacy
61002, Kharkiv, 53 Pushkinska str. E-mail: uiv-2@mail.ru
* National Pirogov Memorial Medical University

Key words: anilides; 2,1-benzothiazines; synthesis; trifluoromethyl group; analgesic activity; diuretic properties

In order to reveal the regularities of the "structure – biological activity" relationship by interaction of esters of 1-R-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ^6,1-benzothiazin-3-carboxylic acids and trifluoromethyl substituted anilines in boiling xylene with good yields and purity the corresponding N-aryl-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ^6,1-benzothiazin-3-carboxamides have been synthesized. The structure of the compounds obtained has been confirmed by the data of elemental analysis and NMR ^{1}H spectroscopy. It has been shown that the presence of trifluoromethyl groups having the powerful electron-withdrawing properties affects the position of signals of the aniline moiety protons: comparing to the spectra of the model methyl derivatives they undergo a significant paramagnetic shift. According to the results of the pharmacological studies conducted it has been found that the replacement of methyl groups in the anilide moiety of 1-R-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ^6,1-benzothiazin-3-carboxamides to trifluoromethyl has a different effect on their analgesic activity, which can remain at the original level, be completely lost or significantly increase. However, N-aryl-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ^6,1-benzothiazin-3-carboxamides definitely lose the ability to influence in any way on the excretory renal function after this chemical modification.

СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ТРИФТОРОМЕТИЛЗАМІЩЕНИХ АНІЛІДІВ 4-ГІДРОКСИ-2,2-ДІОКСО-1H-2λ^6,1-БЕНЗОТІАЗИН-3-КАРБОНОВИХ КИСЛОТ
Л.О.Петрушова, І.В.Українець, С.П.Дзюбенко, Л.О.Гріневич
Ключові слова: *аніліди; 2,1-бензотіазини; синтез; трифторометильна группа; аналгетична активність; діуретичні властивості*
З метою виявлення закономірностей зв'язку «структура – біологічна активність» взаємодією естерів 1-R-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ^6,1-бензотіазин-3-карбонових кислот та трифторометилзаміщених анілінів у киплячому ксилолі з добрими виходами і чистотою синтезовані відповідні N-арил-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ^6,1-бензотіазин-3-карбоксаміди. Будова одержаних сполук доведена даними елементного аналізу та спектроскопії ЯМР ^{1}H. Показано, що присутність трифторометильних груп, які виявляють сильні електроноакцепторні властивості, позначається на положенні сигналів протонів анілідних фрагментів – порівняно зі спектрами модельних метильних похідних вони піддаються суттєвому парамагнітному зсуву. За результатам проведених фармакологічних випробовувань знайдено, що заміна метильних груп в анілідному фрагменті 1-R-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ^6,1-бензотіазин-3-карбоксамідів на трифторометильні по-різному впливає на їх аналгетичну активність, яка може залишатися на вихідному рівні, повністю втрачатися або ж значно посилюватися. А ось здатність впливати будь-яким чином на сечовидільну функцію нирок N-арил-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ^6,1-бензотіазин-3-карбоксаміди після зазначеної хімічної модифікації однозначно втрачають.

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИФТОРМЕТИЛЗАМЕЩЕННЫХ АНИЛИДОВ 4-ГИДРОКСИ-2,2-ДИОКСО-1H-2λ^6,1-БЕНЗОТИАЗИН-3-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ
Л.А.Петрушова, И.В.Украинец, С.П.Дзюбенко, Л.А.Гриневич
Ключевые слова: *анилиды; 2,1-бензотиазины; синтез; трифторметильная группа; анальгетическая активность; диуретические свойства*
С целью выявления закономерностей связи «структура – биологическая активность» взаимодействием сложных эфиров 1-R-4-гидрокси-2,2-диоксо-1H-2λ^6,1-бензотиазин-3-карбоновых кислот и трифторметилзамещенных анилинов в кипящем ксилоле с хорошими выходами и чистотой синтезированы соответствующие N-арил-4-гидрокси-2,2-диоксо-1H-2λ^6,1-бензотиазин-3-карбоксамиды. Строение полученных соединений подтверждено данными элементного анализа и спектроскопии ЯМР ^{1}H. Показано, что присутствие обладающих мощными электроноакцепторными свойствами трифторметильных групп сказывается на положении сигналов протонов анилидных фрагментов – по сравнению со спектрами модельных метильных производных они претерпевают существенный парамагнитный сдвиг. По результатам проведенных фармакологических испытаний найдено, что замена метильных групп в анилидном фрагменте 1-R-4-гидрокси-2,2-диоксо-1H-2λ^6,1-бензотиазин-3-карбоксамидов на трифторметильные по-разному влияет на их анальгетическую активность, которая может оставаться на исходном уровне, полностью теряться или значительно усиливаться. А вот способность влиять каким-либо образом на мочевыделительную функцию почек N-арил-4-гидрокси-2,2-диоксо-1H-2λ^6,1-бензотиазин-3-карбоксамиды после указанной химической модификации однозначно утрачивают.

Due to its powerful electron-withdrawing properties the trifluoromethyl group is able to enhance reactivity of various electrophilic substrates and affect regioselectivity of reactions involving nucleophiles [1-2]. The presence of this substituent often allows to carry out chemical transformations easily that in its absence do not proceed even in the most rigid conditions; thus, it is widely used in modern preparative organic synthesis. By its intensive development chemistry of trifluoromethylated compounds is obliged to the complex of the desirable properties acquired, such as resistance to external factors – temperature, sunlight, oxidation, etc.

The unique effect of the trifluoromethyl substituents on the properties of the molecule as a whole has not remained without attention of medicinal chemistry – their ability to change significantly the interaction of the active ingredient with the target molecule, peculiarities of its metabolism and other pharmacodynamic and/or pharmacokinetic characteristics has been effectively used for a long time when creating new biologically active substances [3]. As a result, the range of drugs currently used is more than three dozen drugs of different pharmacological groups containing one or even a few of the trifluoromethyl fragments in their structure [4]. It is not surprising that this methodology has not lost its significance, and it is used very widely by modern medicinal chemistry [5-12].

Taking into account these circumstances and in continuation of our studies on the methods of synthesis, chemical and biological properties of derivatives of 2,1-benzothiazines, this message is devoted to trifluoromethyl analogues of the methyl-substituted 4-hydroxy-1-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ^6,1-benzothiazin-3-carboxanilides described earlier [13].

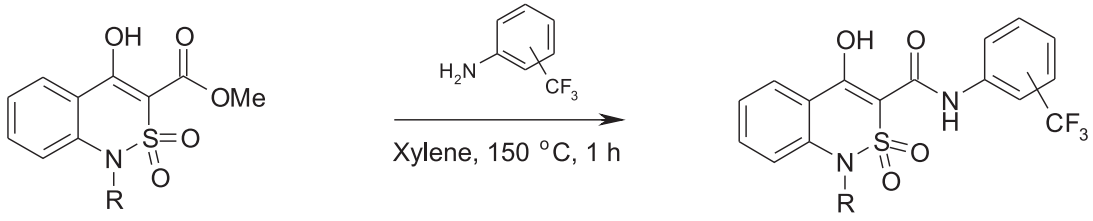
Theoretically, there are several ways of direct trifluoromethylation of organic compounds [14-21]. However, it is quite clear that to obtain the objects of the present study it is advisable to use commercially readily available monotrifluoromethylanilides; in their reaction with esters (**1**) in a boiling xylene the synthesis of the corresponding 1-R-4-hydroxy-1-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ^6,1-benzothiazin-3-carboxanilides **2a-f** has been carried out with good yields and purity (Scheme).

Anilides **2a-f** are white to yellowish white crystalline substances with the narrow melting temperature range (Table 1). They are moderately soluble in DMF, DMSO and ethyl acetate at room temperature, and sparingly soluble in alcohol, are practically insoluble in water, ether and hexane, but readily soluble in hot aqueous alkaline solutions. Their structure was confirmed by elemental analysis and NMR ^{1}H spectroscopy (Tab. 1).

A powerful electron withdrawing effect exhibited by trifluoromethyl groups on the carbon atoms of arylamide moieties, and hence to the protons bound with them, is bound to be reflected in the ^{1}H NMR spectra of anilides **2a-f**. Indeed, compared with the spectra of the model methyl derivatives, resonance signals of the corresponding anilide protons in the spectra of their fluoromethyl analogues **2a-f** undergo a significant paramagnetic shift. Aromatic protons of benzothiazine rings are too far from trifluoromethyl substituents to be affected by them in such a noticeable extent. Therefore, their signals practically do not change their positions in the ^{1}H NMR spectra in going from methyl derivatives to trifluoromethyl ones (see Fig.).

Analgesic properties of the trifluoromethylanilides **2a-f** synthesized were studied in white outbred adult male rats weighing 180-200 g in full compliance with the provisions of the European Convention on Protection of Vertebrates Used for Experimental and Other Scientific Purposes and the Ukrainian Law No. 3447-IV "On protection of animals from severe treatment" (2006).

The standard model of the tail-flick thermal stimulation was used in the study. It allows identifying the central component affecting the nociceptive system in the mechanism of the analgesic effect of the substances studied [22]: the rat's tail tip was immersed in a water bath heated to 54°C, after that the latent period of the tail withdrawal (immersion) expressed in seconds was determined. The substances under research and their structurally similar reference drugs – Meloxicam and Piroxicam – were introduced orally in the form of fine aqueous suspensions stabilized with Tween-80 in the screening dose of 20 mg/kg. The control group received an equivalent amount of water with Tween-80. The analgetic effect (in %) was assessed by the change of the latent period in 1 hour after administration of the test substances.



1 **2a-f**

2: **a** R = H, 2-CF_3; **b** R = H, 3-CF_3; **c** R = H, 4-CF_3; **d** R = Me, 2-CF_3; **e** R = Me, 3-CF_3; **f** R = Me, 4-CF_3

Scheme

Table 1

Characteristics of trifluoromethyl-substituted anilides **2a-f**

Compound	Empirical formula	Found, % / Calculated, %				Mp, °C	Yield, %
		C	H	N	S		
2a	$C_{16}H_{11}F_3N_2O_4S$	49.94 / 50.00	2.80 / 2.88	7.37 / 7.29	8.26 / 8.34	181-182	86
2b	$C_{16}H_{11}F_3N_2O_4S$	49.92 / 50.00	2.95 / 2.88	7.35 / 7.29	8.23 / 8.34	226-228	88
2c	$C_{16}H_{11}F_3N_2O_4S$	50.09 / 50.00	2.97 / 2.88	7.38 / 7.29	8.25 / 8.34	245-247	92
2d	$C_{17}H_{13}F_3N_2O_4S$	51.35 / 51.26	3.37 / 3.29	6.95 / 7.03	7.96 / 8.05	157-159	85
2e	$C_{17}H_{13}F_3N_2O_4S$	51.33 / 51.26	3.34/ / 3.29	6.97 / 7.03	7.95 / 8.05	143-145	91
2f	$C_{17}H_{13}F_3N_2O_4S$	51.31 / 51.26	3.36 / 3.29	7.08 / 7.03	7.99 / 8.05	184-186	94

Seven experimental animals were involved to obtain statistically reliable results of each trifluoromethylanilide **2a-f**, reference drugs in testing and control. The results of biological tests were processed by the method of variation statistics using Student's t-criterion.

The comparative analysis of the experimental data given in Tab. 3 with the results of the previous studies [13] shows that the replacement of the methyl group in the anilide moiety of 1-R-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazin-3-carboxamides to the trifluoromethyl one affects quite ambiguously the ability to suppress the pain reaction. In the case of anilide **2a** it has no effect on this ability, but in the cases of anilides **2b, d, f** it leads to its complete loss. At the same time there are some positive examples, in particular, trifluoromethyl substituted anilides **2c,e** show a significant increase in activity compared to their methyl analogues [13]. According to the level of the analgesic effect revealed they significantly exceed Piroxicam, and are almost as good as Meloxicam.

The effect of trifluoromethylanilides **2a-f** on the urinary function of the kidneys was studied according to the classical method [23] on white outbred rats of both sexes weighing 180-200 g in parallel and compared with Hydrochlorothiazide. All animals received water load in the amount of 25 ml/kg by gavage. The compounds studied were administered orally in the form of a thin aqueous suspension stabilized with Tween-80 in the screening dose of 10 mg/kg, and Hydrochlorothiazide was taken in its effective dose (40 mg/kg). The control group received only simi-

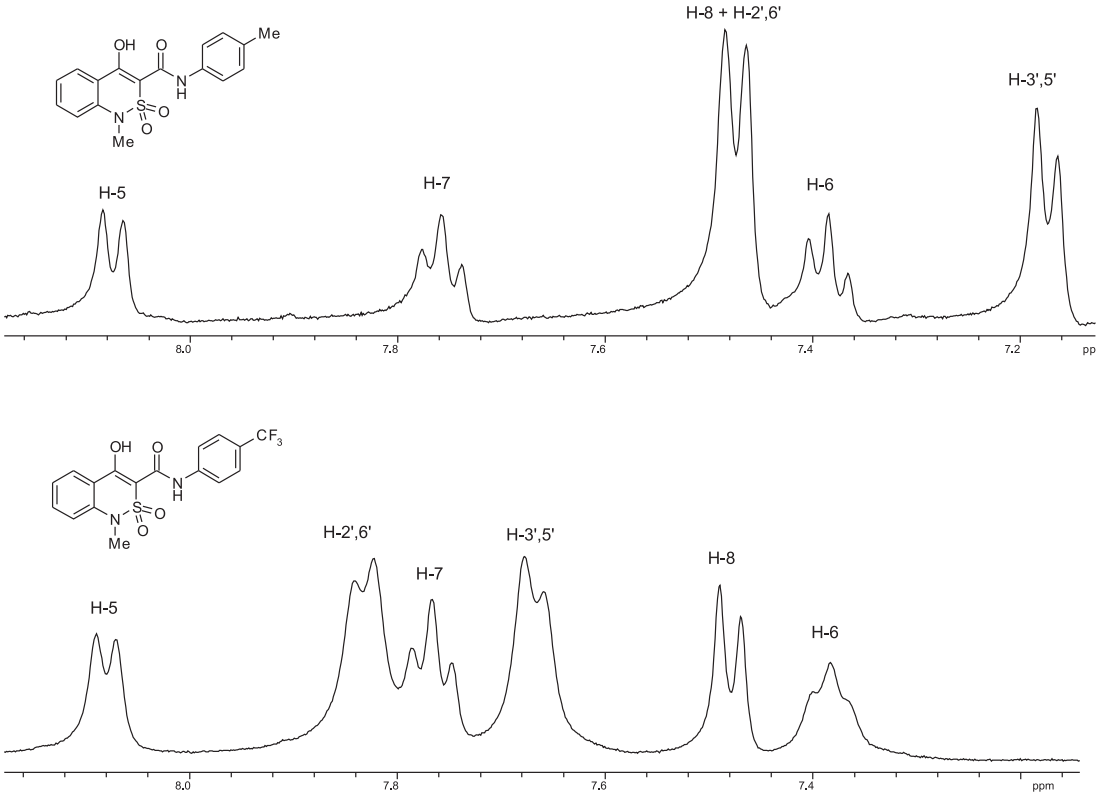


Fig. Fragments of the ^{1}H NMR spectra (signals of aromatic protons) of 4-methyl anilide of 4-hydroxy-1-methyl-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazin-3-carboxylic acid [13] and its 4-trifluoromethyl substituted analogue **2f**.

Table 2

^{1}H NMR Spectra of trifluoromethyl-substituted anilides **2a-f**

Compound	Chemical shifts, δ, ppm (*J*, Hz)
2a	15.15 (1H, br. s, OH); 12.28 (1H, br. s, SO_2NH); 9.63 (1H, s, CONH); 8.03-7.98 (2H, m, H-5.6′); 7.75 (1H, d, *J* = 7.8, H-3′); 7.70 (1H, t, *J* = 7.7, H-4′); 7,64 (1H, t, *J* = 7.7, H-7); 7.46 (1H, t, *J* = 7.7, H-5′); 7.28 (1H, t, *J* = 7.7, H-6); 7.22 (1H, d, *J* = 8.3, H-8)
2b	15.18 (1H, br. s, OH); 12.30 (1H, br. s, SO_2NH); 9.71 (1H, s, CONH); 8.06 (1H, s, H-2′); 8.01 (1H, d, *J* = 7.9, H-5); 7.80 (1H, d, *J* = 7.9, H-6′); 7.63 (1H, t, *J* = 7.6, H-7); 7.58 (1H, t, *J* = 7.9, H-5′); 7.47 (1H, d, *J* = 7.5, H-4′); 7.28 (1H, t, *J* = 7.6, H-6); 7.21 (1H, d, *J* = 8.3, H-8)
2c	15.16 (1H, br. s, OH); 12.28 (1H, br. s, SO_2NH); 9.79 (1H, s, CONH); 8.00 (1H, d, *J* = 7.9, H-5); 7.84 (2H, d, *J* = 8.0, H-2′,6′); 7.67 (2H, d, *J* = 8.0, H-3′,5′); 7.62 (1H, t, *J* = 7.7, H-7); 7.27 (1H, t, *J* = 7.6, H-6); 7.21 (1H, d, *J* = 8.1, H-8)
2d	14.93 (1H, br. s, OH); 9.66 (1H, s, CONH); 8.09 (1H, d, *J* = 7.9, H-5); 7.99 (1H, d, *J* = 8.0, H-6′); 7.78 (1H, t, *J* = 7.9, H-4′); 7.74 (1H, d, *J* = 7.9, H-3′); 7.70 (1H, t, *J* = 7.9, H-7); 7.49 (1H, d, *J* = 8.4, H-8); 7.44 (1H, t, *J* = 7.9, H-5′); 7.39 (1H, t, *J* = 7.5, H-6); 3.51 (3H, s, N-Me)
2e	14.98 (1H, br. s, OH); 9.82 (1H, s, CONH); 8.09 (1H, d, *J* = 7.9, H-5); 8.05 (1H, s, H-2′); 7.81 (1H, d, *J* = 7.9, H-6′); 7.76 (1H, t, *J* = 7.8, H-7); 7.59 (1H, t, *J* = 7.9, H-5′); 7.50-7.45 (2H, m, H-8.4′); 7.38 (1H, t, *J* = 7.6, H-6); 3.50 (3H, s, N-Me)
2f	15.02 (1H, br. s, OH); 9.80 (1H, s, CONH); 8.08 (1H, d, *J* = 7.9, H-5); 7.83 (2H, d, *J* = 8.0, H-2′,6′); 7.77 (1H, t, *J* = 7.7, H-7); 7.66 (2H, d, *J* = 8.0, H-3′,5′); 7.48 (1H, d, *J* = 8.3, H-8); 7.38 (1H, t, *J* = 7.4, H-6); 3.50 (3H, s, N-Me)

lar amount of water with Tween-80. After that the experimental animals were placed in "metabolism cages". The amount of urine excreted by the animals within 4 hours was the indicator of the intensity of uropoiesis. The results obtained (Tab. 4) show that when transferring from the methyl derivatives to trifluoromethyl ones the ability of *N*-aryl-4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ^6,1-benzothiazin-3-carboxamides to increase or, conversely, inhibit diuresis is completely lost. Therefore, in the search for new potential diuretics our chemical modification is impractical.

Experimental Part

^{1}H NMR spectra of the compounds synthesized were recorded on a Varian Mercury-400 device (with the operating frequency of 400 MHz) in the solution of DMSO-d_6, the TMS internal standard. Elemental analysis was performed by an EuroVector EA-3000 microanalyzer. Melting points were determined in the capillary on a SMP10 Stuart digital analyzer of the melting point. The initial esters of 1-R-4-hydroxy-1-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ^6,1-benzothiazin-3-carboxylate (**3**) were synthesized by the method described earlier [24].

Trifluromethyl anilides of 1-R-4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ^6,1-benzothiazin-3-carboxylic acids (2a-f). General Procedure. Thoroughly stir the mixture of 0.01 mol of ester **1** and 0.01 mol of the corresponding trifluoromethyl substituted aniline in 5 ml of a dry xylene and heat on a metal bath at 150°C for 1 h. Cool the reaction mixture, add 5 ml of ethanol and allow to stand for several hours at room temperature. Filter the resulting crystals of trifluoromethylanilide **2a-f**,

Table 3

The analgesic properties of anilides **2a-f** on the "tail-flick" model in rats

Compound	R	Position CF_3	The latent period in 1 h after administration of the compounds, s	Change of the latent period, compared to control, %
2a	H	2	3.14±0.11	0
2b	H	3	3.15 ±0.10	0
2c	H	4	4.84 ±0.14*	+ 54.0
2d	Me	2	3.69±0.12*	+17.6
2e	Me	3	4.50 ±0.15*	+43.2
2f	Me	4	3.40±0.12	+8.3
Meloxicam	-	-	4.91±0.17*	+56.3
Piroxicam	-	-	3.96±0.15*	+ 26.1
Control	-	-	3.14±0.14	-

* – differences were significant at p<0.05 compared to the control.

Table 4

The diuretic activity for anilides **2a-f** and Hydrochlorothiazide

Compound	Diuresis within 4 h, ml	Diuretic activity * %
2a	4.04±0.26	–5
2b	4.89±0.32	+15
2c	4.77±0.30	+12
2d	3.96±0.25	–7
2e	4.38±0.31	+3
2f	4.56±0.35	+7
Hydrochlorothiazide	6.43±0.38**	+51
Control	4.26±0.33	-

* "+" – increase, "–" – inhibition of diuresis compared to the control taken as 100%; ** – differences were significant at p<0.05 compared to the control.

wash with cold ethanol and dry. Crystallize from the mixture of DMF/ethanol.

Conclusions

1. Triflurомethyl-substituted anilides of 4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazin-3-carboxylic acids have been synthesized in order to identify the structural and biological regularities that are important for the subsequent search for new analgesics and diuretics in a series of 2,1-benzothiazine.

2. As a result of the pharmacological screening it has been found that the presence of trifluoromethyl groups in the anilide moiety of *N*-aryl-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazin-3-carboxamides positively affects their analgesic properties, but it does not provide the diuretic activity.

References

1. *O'Connor M. J., Boblak K. N., Topinka M. J., Kindelin P. J., Briski J. M., Zheng C., Klumpp D. A. Journal of the American Chemical Society, 2010, Vol. 132, No.10, pp.3266-3267. DOI: 10.1021/ja1001482.*
2. *True J. E., T. D., Winter R. W., Gard G. L. Inorganic Chemistry, 2003, Vol. 42, No.14, pp.4437-4441. DOI: 10.1021/ic0343298.*
3. *Yale H. L. Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 1959, Vol. 1, No.2, pp.121-133. DOI: 10.1021/jm50003a001.*
4. *Kleemann A., Engel J., Kutscher B., Reichert D. Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications of the most relevant APIs, 5-th ed. Stuttgart, Thieme, 2008.*
5. *Luzina E. L., Popov A. V. Journal of fluorine chemistry, 2014, Vol. 168, pp.121-127.*
6. *Pasquier B., El-Ahmad Y., Filoche-Rommé B., Dureuil-Sizaire C., Fassy F., Abecassis P. Y., Mathieu M., Bertrand T., Benard T., Barrière C., El Batti S., Letallec J. P., Sonnefraud V., Brollo M., Delbarre L., Loyau V., Pilorge F., Bertin L., Richepin P., Arigon J., Labrosse J. R., Clément J., Durand F., Combet R., Perraut P., Leroy V., Gay F., Lefrançois D., Bretin F., Marquette J. P., Michot N., Caron A., Castell C., Schio L., McCort G., Goulaouic H., Garcia-Echeverria C., Ronan B. P. Journal of Medicinal Chemistry, 2015, Vol. 58, No.1, pp.376-400. DOI: 10.1021/jm5013352.*
7. *Wang Z., Sims C. R., Patil N. K., Gokden N., Mayeux P. R. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2015, Vol. 352, No.1, pp.61-66. DOI: 10.1124/jpet.114.219394.*
8. *Raffai G., Khang G., Vanhoutte P. M. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2015, Vol. 352, No.1, pp.14-22. DOI: 10.1124/jpet.114.217935.*
9. *Birrell G. W., Chavchich M., Ager A. L., Shieh H. M., Heffernan G. D., Zhao W., Krasucki P. E., Saionz K. W., Terpinski J., Schiehser G. A., Jacobus L. R., Shanks G. D., Jacobus D. P., Edstein M. D. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, Vol. 59, No.1, pp.70-7. DOI: 10.1128/AAC.03762-14.*
10. *Mathys M., Kraft P. Chemistry & Biodiversity, 2014, Vol. 11, No.10, pp.1597-607. DOI: 10.1002/cbdv.201400011.*
11. *Abdellatif K. R., Moawad A., Knaus E. E. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2014, Vol. 24, No.21, pp.5015-5021. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.09.024.*
12. *Moreno-Rodríguez A., Salazar-Schettino P. M., Bautista J. L., Hernández-Luis F., Torrens H., Guevara-Gómez Y., Pina-Canseco S., Torres M. B., Cabrera-Bravo M., Martinez C. M., Pérez-Campos E. European Journal of Medicinal Chemistry, 2014, Vol. 87, pp.23-29. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.09.027.*
13. *Ukrainets I. V., Petrushova L. O., Dzyubenko S. P. Zhurnal Organichnoi ta Farmatsevtichnoi Khimii – Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry, 2014, Vol. 12, No.2(46), pp.53-58.*
14. *Ren Tomita, Yusuke Yasu, Takashi Koike, Munetaka Akita. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2014, Vol. 10, pp.1099-1106. DOI: 10.3762/bjoc.10.108.*
15. *Naeem Iqbal, Sungkyu Choi, Euna Ko, Eun Jin Cho. Tetrahedron Letters, 2012, Vol. 53, No.15, pp.2005-2008.*
16. *Stahly G. P., Bell D. R. The Journal of Organic Chemistry, 1989, Vol. 54, No.12, pp.2873-2877. DOI: 10.1021/jo00273a020.*
17. *Ji Y., Brueckl T., Baxter R. D., Fujiwara Y., Seiple I. B., Su S., Blackmond D. G., Baran P. S. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, Vol. 108, No.35, pp.14411-14415. DOI:10.1073/pnas.1109059108.*
18. *Zhang Cai. Organic & Biomolecular Chemistry, 2014, Vol. 12, No.34, pp.6580-6589. DOI: 10.1039/C4OB00671B.*
19. *Cho E. J., Senecal T. D., Kinzel T., Zhang Y., Watson D. A., Buchwald S. L. Science, 2010, Vol. 328, No.5986, pp.1679-1681. DOI: 10.1126/science.1190524.*
20. *Ma J.-A., Cahard D. Journal of Fluorine Chemistry, 2007, Vol. 128, No.9, pp.975-996. DOI: 10.1016/j.jfluchem.2007.04.026.*
21. *Deng Q.-H., Wadepohl H., Gade L. H. Journal of the American Chemical Society, 2012, Vol. 134, No.26, pp.10769-10772. DOI: 10.1021/ja3039773.*
22. *Vogel H. G. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. Berlin, Springer; 2008, pp.1011-1013.*
23. *Sernov L. N., Gatsura V. V. Elementy eksperimentalnoi farmakologii (Elements of Experimental Pharmacology). Moscow, Nauka, 2000, pp.103-104.*
24. *Ukrainets I. V., Petrushova L. A., Dzyubenko S. P. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2013, Vol. 49, No.9, pp.1378-1383.*

Надійшла до редакції 15.01.2015 р.

УДК 615.012.1:547.789.1

СТВОРЕННЯ ІННОВАЦІЙНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ (ПІДХОДИ ТА МЕТОДОЛОГІЯ *DRUG DESIGN*) – ОДНЕ З КЛЮЧОВИХ ПИТАНЬ СУЧАСНОЇ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ОСВІТИ

А.П.Крищишин, Д.В.Камінський, Р.Б.Лесик

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького
79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69. E-mail: dr_r_lesyk@org.lviv.net; roman.lesyk@gmail.com

Ключові слова: drug-design (конструювання ліків); медична хімія; комп'ютерні технології; освіта

Представлені сучасні підходи до створення інноваційних лікарських засобів на основі малих молекул (small molecules), об'єднаних у систему досліджень – drug design (конструювання ліків). Представлені найпоширеніші концепції та етапність процесів створення інноваційних лікарських засобів з використанням концепції «від ідеї – до препарату». Показано важливість та роль комп'ютерних (in silico) методів у створенні лікарських засобів, що відображено у прийомах CADD (computer assisted drug design), наприклад: QSAR-аналіз, докінгові дослідження, молекулярне моделювання, оцінка подібності, лікоподібність тощо). Висвітлені підходи на сучасному етапі є домінантними у створенні інноваційних ЛЗ та є предметом постійного інтересу наукової спільноти. Більшість основних моментів є інтегрованою в навчальні курси студентів-фармацевтів (на рівні PharmD та MS у західних країнах) в рамках дисципліни Медична хімія (Medicinal Chemistry) та представлена в авторитетних підручниках. Натомість в Україні ці питання практично залишені поза увагою та начальною програмою підготовки провізорів. Показана необхідність висвітлення сучасного стану проблематики створення лікарських засобів при підготовці студентів-фармацевтів, враховуючи принцип цілісності фармацевтичної галузі та опираючись на згадану холістичну концепцію «від ідеї – до препарату». Це дозволить ліквідувати розбіжності (і/або гармонізувати їх) між «західною» та пострадянською системами освіти, зокрема і в контексті викладання медичної/фармацевтичної хімії. Один з можливих варіантів вирішення такої ситуації є запроваджений нами курс «Комп'ютерні технології у фармації» (для студентів 4-го курсу), який дає можливість вивчення загальних підходів сучасного drug design.

CREATION OF INNOVATIVE DRUGS (APPROACHES AND METHODOLOGY OF DRUG DESIGN) – ONE OF THE MAIN ISSUES OF THE MODERN PHARMACEUTICAL EDUCATION

A.P.Kryshchyshyn, D.V.Kaminskyy, R.B.Lesyk

Key words: *drug design; medicinal chemistry; computer technology; education*

The article is devoted to modern approaches to the creation of innovative drugs based on the so-called small molecules combined into the research system – drug design. The most common concepts and phasing of the processes of the innovative drug creation based on the concept "from idea – to a drug" are presented. The importance and role of the computer (in silico) methods in creating drugs reflected in CADD (computer assisted drug design) methods, for instance: QSAR-analysis, docking studies, molecular modeling, assessment of similarity and druglikeness, etc.) are discussed. Currently, being the permanent subject of interest of the scientific community, the approaches described are dominant in creating innovative drugs. Most of the major issues are integrated in training of pharmacy students (PharmD and MS levels in Western countries) within the discipline "Medicinal Chemistry" and are described in authoritative textbooks. At the same time, practically no attention is paid to these issues in Ukraine, and they are beyond the curricula for pharmacy students. There is the necessity of coverage of the current state of drug creation when training pharmacy students taking into account the principle of integrity of the pharmacy branch and based on the "from idea – to a drug" holistic concept mentioned. It allows to fill in the gaps between "western" and post-Soviet education systems (and/or their harmonization), especially in the context of teaching Pharmaceutical/Medicinal Chemistry. One of the possible solutions is our course "Computer Technology in Pharmacy" (for the 4th year students) covering the main milestones of drug design.

СОЗДАНИЕ ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ПОДХОДЫ И МЕТОДОЛОГИЯ DRUG DESIGN) – ОДИН ИЗ КЛЮЧЕВЫХ ВОПРОСОВ СОВРЕМЕННОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

А.П.Крищишин, Д.В.Каминский, Р.Б.Лесык

Ключевые слова: *drug-design (конструирование лекарств); медицинская химия; компьютерные технологии; образование*

В работе представлены современные подходы к созданию инновационных лекарственных средств на основе так называемых малых молекул (small molecules), которые объединены в систему исследований drug design (конструирование лекарств). Представлены самые распространенные концепции и этапность процессов создания инновационных лекарственных средств (ЛС) с использованием концепции «от идеи – к препарату». Показана значимость и роль компьютерных (in silico) методов в создании лекарственных средств, что отражено в приемах CADD (computer assisted drug design), например: QSAR-анализ, докинговые исследования, молекулярное моделирование, оценка сходства, druglikeness и т. д.). Рассмотренные подходы на современном этапе являются доминантными в создании инновационных ЛС и являются предметом постоянного интереса научного сообщества. Большинство основных моментов интегрированы в учебные курсы студентов-фармацевтов (на уровне PharmD и MS в западных странах) в рамках дисциплины Медицинская химия (Medicinal Chemistry) и представлены в авторитет-

ных учебниках. В Украине же эти вопросы практически оставлены без внимания и за рамками учебных программ подготовки провизоров. Показана необходимость освещения современного состояния проблематики создания лекарственных средств при подготовке студентов-фармацевтов, учитывая принцип целостности фармацевтической отрасли и опираясь на упомянутую холистическую концепцию «от идеи – к препарату». Это позволит ликвидировать разногласия (и/или гармонизировать их) между «западной» и постсоветской системами образования, в том числе и в контексте преподавания медицинской/фармацевтической химии. Один из возможных вариантов решения такой ситуации является введенный нами курс «Компьютерные технологии в фармации» (для студентов 4-го курса), который дает возможность изучения общих подходов современного drug design.

Світ з кожним роком стає все динамічнішим, інноваційні технології впроваджуються буквально у всі сфери життєдіяльності людини, і фармацевтична галузь не є виключенням [1]. Фахівці фармацевтичної індустрії повинні володіти широкими знаннями як у царині фундаментальних фармацевтичних/медичних наук, так і бути обізнаними із сучасними методами та підходами до створення лікарських засобів (ЛЗ). На жаль, роль сучасного провізора в Україні на сьогодні зводиться до реалізації лікарських засобів, і лише незначний відсоток спеціалістів після закінчення ВНЗ працює в галузі створення/виробництва лікарських засобів. Проте саме створення інноваційних лікарських засобів є одним з головних завдань фармацевтичної галузі, враховуючи принцип її цілісності та роль фармакотерапії в системі охорони здоров'я [2]. Питанням розробки інноваційних лікарських засобів (не слід плутати із синтезом/виробництвом вже відомих) приділяється дуже мало уваги, в тому числі і в процесі навчання як студентів фармацевтичних факультетів, так і на рівні післядипломної освіти провізорів в Україні. Тому холістична концепція «*від ідеї – до препарату*» є базисною як для фармацевтичної галузі загалом, так і в навчанні майбутніх фахівців зокрема.

Метою даної роботи є відображення спроб впровадження даної концепції у навчальний процес студентів-фармацевтів для модернізації (і/або гармонізації із західними зразками) фармацевтичної освіти в Україні.

На сьогодні однією із вдалих ілюстрацій наведеної вище концепції, на наш погляд, може служити силденафіл, історія впровадження і використання якого включає: фундаментальні дослідження ролі оксиду азоту; дослідження родини фосфодіестераз; дизайн високоафінних/селективних інгібіторів; доклінічні та клінічні дослідження; впровадження Viagra® для лікування еректильної дисфункції; впровадження генериків та аналогів; продовження досліджень артеріальної/легеневої гіпертензії (в тому числі NO-асоційованих процесів); впровадження Revatio® для лікування легеневої артеріальної гіпертензії.

Сучасні підходи та методологія створення інноваційних лікарських засобів

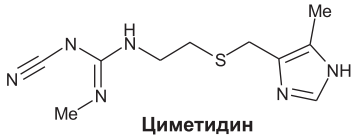
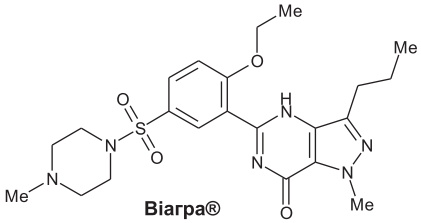
В останні десятиліття сучасна фармацевтична індустрія відчуває нестачу нових унікальних препаратів [3]. Одна з найважливіших причин зменшення кількості нових ЛЗ пов'язана з уже досягнутими високими терапевтичними стандартами. У теперішній час дослідження зосереджуються на пошуках середників для лікування хронічних дегенеративних та інших «соціально-значущих» захворювань, таких як ішемічна хвороба серця, хвороба Альцгеймера, артрити, рак, СНІД та ін. Високі вимоги до ефективності та безпечності ЛЗ також суттєво впливають на зниження темпів створення останніх. Тому актуальним завданням науково-дослідницького сектора фармацевтичної галузі стала генерація/реалізація принципово нових підходів до створення оригінальних лікарських субстанцій, що базуються на сучасній біотехнології, генній інженерії, удосконаленій методології фармацевтичного органічного синтезу тощо. Есенціальним у створенні будь-якого лікарського засобу є розуміння згаданого шляху «*від молекули – до препарату*» як безперервного процесу, що на різних етапах залучає всі сектори фармацевтичної галузі: від науково-освітнього до виробництва і постмаркетингових досліджень.

Процес створення нових ЛЗ можна умовно поділити на наступні фази: 1) пошук і конструювання сполук-лідерів (lead-compounds) (базових сполук), оптимізація сполук-лідерів (створення кандидатів на лікарський засіб (drug-candidates); 2) доклінічні дослідження; 3) клінічні дослідження; 4) впровадження лікарського засобу в медичну практику; 5) постмаркетингові дослідження. Причому реалізація перших трьох етапів в середньому охоплює 10-12 років і затрати, що перевищують міліард доларів.

Бурхливий розвиток молекулярної біології, комп'ютерної хімії, як і еволюція форм та методів медичної/фармацевтичної хімії докорінно змінили підходи до створення нових ЛЗ, які, у свою чергу, трансформувалися і були об'єднані у систему наукових досліджень – *drug design* (конструювання ліків) з використанням великого спектра *in silico* (комп'ютерних) методів. Ключовим моментом усіх підходів drug design є спрямований синтез сполук-лідерів, кандидатів на лікарські засоби та наступна їх оптимізація з врахування усіх ADME/Tox (Absorbsion – абсорбція, Distribution – розподіл, Metabolism – метаболізм, Elimination – виділення, Toxicity – токсичність) параметрів [4-8]. Різноманіття підходів у створенні нових лікарських

Таблиця 1

Основні стратегії пошуку інноваційних ЛЗ

Концепція	Основний зміст	Приклади успішного використання
Тотальний скринінг	Систематичний скринінг великого набору сполук, які довільно вибираються з усіх можливих/доступних варіантів	**Стрептоміцин**
Модифікація і удосконалення молекул ЛЗ	Розпочавши з відомих активних сполук, через хімічні трансформації можна одержати нові сполуки з більшою ефективністю і безпечністю, кращою специфічністю і в формі, яка є легшою для застосування	 **Циметидин**
Використання інформації, яка з'являється в результаті досліджень у галузі біології і медицини	В основу покладені клінічні спостереження побічних (не основних) ефектів ЛЗ чи сполук на етапі клінічних досліджень	 **Віагра®**
Логічний дизайн діючої речовини	Базується на детальному знанні патологічної дисфункції на молекулярному рівні, особливо пов'язаних з ідентифікацією і структурним дослідженням нових рецепторів чи ензимів, «задіяних» при розвитку певного захворювання	**Каптоприл**

засобів на основі ретроспективного аналізу узагальнено у наступній концепції (табл. 1) [4, 9].

Сьогодні на фармацевтичному ринку домінують ліки на основі так званих малих молекул (small molecules) і більш ніж 80% кандидатів на лікарські засоби та сполуки, що проходять клінічні дослідження, якраз і є такими низькомолекулярними сполуками. Висока вартість розробок та виробництва «біологічних лікарських засобів» і надалі залишає відкритий простір для розвитку ЛЗ на основі дешевих малих молекул [3]. Тим не менше, для розробки доступних та ефективних препаратів на сьогодні виділяють наступні аспекти: *i*) різке скорочення витрат виробництва біологічних препаратів; *ii*) суттєве «поліпшення ліків» при застосуванні комп'ютерних та комбінаторних методів; *iii*) повернення до масштабних досліджень природних продуктів як джерел ЛЗ; *iv*) створення ЛЗ шляхом раціонального дизайну структури молекули та застосування біоміметиків, що, можна сподіватись, буде супроводжуватися «серендипністю» (явище випадкового знаходження чогось вдалого, особливо коли людина шукає щось інше) та інтуїцією дослідників [9].

На межі між біоміметичним підходом та раціональним дизайном ліків є синтез так званих гібридних молекул із подвійним механізмом дії для одержання нових ефективних ЛЗ. З такої точки зору гібридна молекула визначається як сполука з двома структурними доменами, які мають різні біологічні ефекти та, ймовірно, подвійну активність; це означає, що гібридна молекула може діяти як два різних фармакофори [10-12].

Аналіз структур різноманітних ЛЗ привів медичних хіміків до ідентифікації деяких молекулярних фрагментів, з якими висока біологічна активність пов'язана частіше, ніж з іншими структурами. Такі молекулярні фрагменти були названі привілейованими структурами (privileged scaffold), маючи на увазі суб-структури, які володіють активністю відносно двох чи більше рецепторів. Зміст цього визначення полягає в тому, що привілейовані структури надають основу для молекули, а зміна субституєнтів у них надає специфічності до конкретного рецептора [13, 14]. Прикладом такого підходу є блокатори кальцієвих каналів, які вміщують дигідропіридиновий фрагмент, що належить до привілейованих структур.

Розробка ЛЗ включає в себе також покращення фармацевтичних і фармакокінетичних властивостей активної сполуки для того, щоб зробити його зручним для клінічного застосування. При цьому інколи необхідно вдаватися до структур-

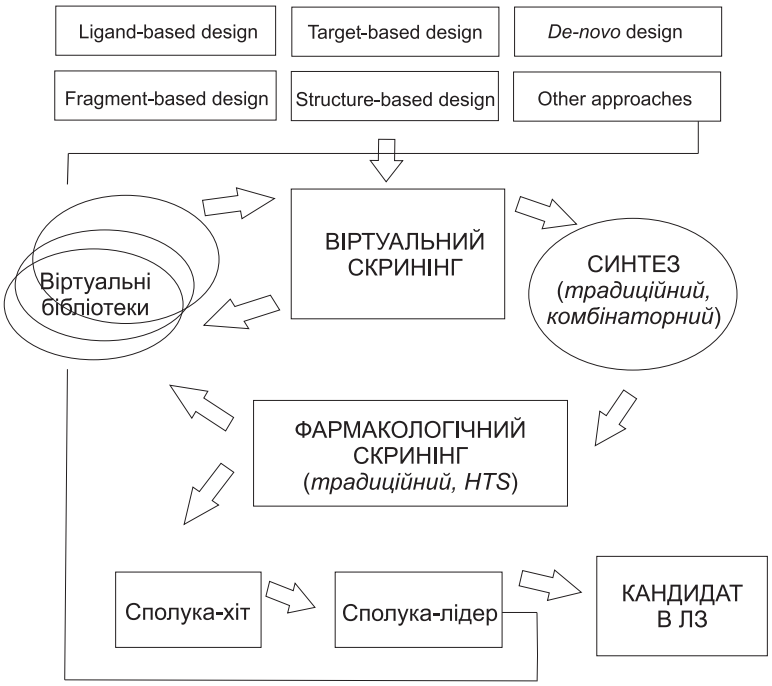


Рис. Взаємозв'язок сучасних підходів у конструюванні лікарських засобів.

ної модифікації і навіть синтезу нових структур. В цьому випадку використовують наступні можливі підходи:

– створення *біоізостерних сполук* (біоізостер – хімічна група, здатна замінити іншу хімічну групу, не суттєво змінивши при цьому тривимірну молекулярну структуру і тим самим фізіологічну активність);

– створення *проліків* (pro-drugs) – сполук, які не проявляють виразної фізіологічної активності, але здатні перетворюватися на активні сполуки шляхом ферментативної реакції або хімічним (без участі білкового каталізатора) шляхом. Прикладом може служити азатіоприм, який є проліком 6-меркаптопурину [15, 16], еналаприл тощо;

– створення *м'яких ліків* (soft drugs) – сполук, фармакологічний ефект яких локалізований у визначеному місці. Цей прийом був використаний при створенні протиглаукомних лікарських засобів [17];

– біфармакофорний підхід, що полягає у створенні *подвоєних ліків* (twin drugs) – фізіологічно активних сполук, молекула яких містить дві ковалентно з'єднані фармакофорні групи [18]. Класичним прикладом такого підходу є симетрична бінарна молекула BDHP, активність якої приблизно в 10 разів більша, ніж активність її моноскладової – нітрендипіну (антагоніста кальцієвих каналів). Крім того, подвоєні ліки можуть містити неідентичні молекулярні фрагменти. Так, можлива побудова складних *бінарних структур* (double drug), які вміщують декілька функціонально значущих частин молекули (фармакофорних угрупувань) з різними біологічними механізмами впливу. Зважаючи на спільні риси зазначених підходів та неоднозначність у трактуванні, всі наведені групи об'єднують терміном co-drug [15];

– *селективна оптимізація побічних ефектів* відомих засобів – стратегія цього підходу базується на факті, що всі ліки впливають на велику кількість рецепторів/ферментів (відомих і невідомих) (т. з. поліфармакологічний підхід). На певні рецептори/ферменти лікарські засоби можуть впливати сильно, а на інші – слабко чи взагалі не впливати. Селективна оптимізація побічної активності передбачає модифікацію структури активної речовини з метою посилення ефекту на ті рецептори/ферменти, на які вона діяла слабко, та зменшення або усунення попередньої основної дії [9].

До зародження сучасної синтетичної органічної хімії метою дослідників на першій стадії було створення окремих речовин максимально можливої чистоти. Багато нових органічних молекул у такий спосіб розглядалися як попередники ліків для вивчення біологічної активності. Зрозуміло, що такий процес був довготривалим у часі і вимагав великих коштів. Останнім часом впроваджено ряд новітніх технологій, які радикально змінили початковий етап створення лікарських засобів. Серед них: *комбінаторна хімія* (combinatorial chemistry); *тотальний високоефективний скринінг* (high throughput screening – HTS) [19]; *віртуальний скринінг* (Virtual Screening) [20]; *молекулярне моделювання* (Molecular Modelling); *автоматизація процесів синтезу, очистки та скринінгу* (Automation) (рисунок). Названі сучасні підходи використовуються на всіх рівнях процесу конструювання лікарських засобів (drug design).

Побудова бібліотек сполук. Процес створення бібліотек речовин у цілому може розглядати-

ся як ітераційна процедура, коли одна бібліотека стає основою для створення нової, і складається з наступних етапів:

– планування бібліотеки;
– відбір структурних блоків (building blocks);
– хімічна апробація синтезу;
– синтез бібліотеки;
– біологічний скринінг;
– ідентифікація активних сполук;
– доведення активності;
– інтерпретація результатів.

При плануванні бібліотеки, в першу чергу, визначають ціль проведення скринінгу. Підхід на основі підбору ліганду до мішені, будова якої невідома, і немає відомостей про структуру сполук, здатних з нею зв'язуватися, називається «скринінг навмання» – random screening. Такий скринінг передбачає перевірку активності великої різноманітності структур, в результаті чого буде отримана величезна бібліотека або сукупність декількох дрібніших, тобто скринінг зведеться до виявлення активності в «океані неактивності». На противагу цьому цільові (directed or focused) бібліотеки містять споріднені структури, що, як правило, відрізняються тільки замісниками і мають значно менший розмір порівняно з масивами для broad або random screening. При цьому всі складові бібліотеки, як правило, володіють активністю, і вибір зводиться до ідентифікації сполук з найвищою афінністю до біомакромолекули. Способи конструювання бібліотек цих двох типів відрізняються кількістю використовуваних структурних блоків, розміром носіїв, стратегією декодування. Слід звернути увагу на те, що дані характеристики стосуються як реальних, так і віртуальних бібліотек сполук, в останньому випадку синтетична частина упускається, а всі експериментальні дослідження замінено на *in silico* імітації та прогнозування.

Комбінаторна хімія. Сьогодні термін «комбінаторна хімія» [21] застосовується до стратегії синтезу великих масивів органічних сполук і визначається як сукупність високотехнологічних методів, що дозволяють отримати за короткий термін часу від декількох сотень до десятків тисяч речовин. Згідно з номенклатурою ІЮПАК комбінаторна хімія використовує комбінаторний процес для приготування набору сполук з рядів building blocks, які також можна вважати прикладами комбінаторних бібліотек, загаданих вище. Комбінаторний синтез – це синтез великих рядів сполук у мікрокількостях для подальшого, як правило, високоефективного скринінгу. Комбінаторні бібліотеки можуть бути масивами індивідуальних речовин і/або сумішей, їх зручно описувати за допомогою загальної формули, яка отримала назву scaffold. Scaffold – це базова структура, в різних положення якої варіюються замісники, так звані точки рандомізації. Наприклад, scaffold, в якому три різні замісники (R^1-R^3 по 10 варіантів кожен) описує бібліотеку з 1000 сполук. Синтетичні підходи комбінаторної хімії класифікуються на дві категорії: паралельний синтез (parallel synthesis); синтез за методом «*діли та змішуй*» (portioning-mixing або «split & mix» method). Останній базується на процедурі Мерріфілда. Синтез виконується шляхом повторення трьох простих операцій: поділ твердого носія на рівні порції ⇒ взаємодія кожної порції індивідуально з відповідними мономерами (напр., амінокислотами) ⇒ гомогенне змішування порцій. *Паралельний синтез* спрямований на одержання індивідуальних речовин. При цьому ряди сполук готуються одночасно в масивах фізично відокремлених реакційних посудин чи мікровідділень без взаємозміни протягом взаємодії реагентів. Усі операції, в т. ч. усунення захисних груп, сполучення, промивання і навіть розкладення, проводяться, як правило, на твердому носії [21-23].

Високоефективний фармакологічний скринінг. Для того, щоб дослідити величезну кількість зразків, яку здатна генерувати комбінаторна хімія за порівняно короткий час, потрібні автоматичні методи швидкого біологічного скринінгу. Таким методом є високоефективний скринінг сполук [24]. Цей аналіз включає, як правило, «проби» на ферментну активність, дію на клітинні рецептори (імунофлуорисцентний та радіоімунний метод) з використанням надмалих кількостей субстанцій (пікомолі). Використання роботизованої техніки, що контролюється відповідним програмним забезпеченням, чутливі детектори та комп'ютеризована обробка даних дозволяють дослідникові швидко проводити мільйони хімічних, генетичних і фармакологічних тестів. Результати цих експериментів дозволяють створення не тільки бази активних сполук для розробки ліків, але й отримання інформації для розуміння взаємодії або ролі конкретного біохімічного процесу в біології.

Зважаючи на вищесказане, ключовим моментом в drug design є використання комп'ютерних технологій та уніфікація методів представлення/обробки хімічної структури речовин, що реалізується шляхом використання специфічних хімічних програмних пакетів (наприклад, ChemOffice Ultra 2005 v.9.0 (http://www.cambridgesoft.com, CambridgeSoft, Commercial; ChemWindow 5.1 (FreeWare)/6.0 (Commercial) (www.softshell.com / www.bio-rad.com та ін.). Існують різні типи файлів для представлення хімічної структури та роботи зі специфічною хімічною інформацією (*.cml* – CML (Chemical Markup Language), *.sdf* – SDF (Structural Data format), *.pdb* – PDB (Protein Data Bank), *.skc* – IsisDraw file, *.smiles,*

.smi – SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specifications), *mol* – MDL Molfile,*.hin* – HyperChem HIN file тощо), які використовуються для реалізації різних завдань у різних сферах, таких як обробка та побудова бази даних хімічних структур, програми візуалізації, моделювання чи молекулярного докінгу [25].

Віртуальний скринінг. Віртуальний скринінг – це відбір та відсіювання речовин у межах віртуальних бібліотек з використанням різних дескрипторів, фільтрів, теорій, алгоритмів тощо і, як правило, відповідного програмного забезпечення для знаходження потенційних біологічно активних сполук серед віртуально можливих. Крім того, іншим можливим використанням віртуального скринінгу є прогнозування біологічної активності віртуальних сполук. Перед початком скринінгу, як правило, необхідно ідентифікувати мішень (мету), на яку має бути скерована дія майбутнього лікарського засобу. Цей принцип лежить в основі т. з. мішень-орієнтованого (target-based design) віртуального скринінгу [26]. Коли мішень є обраною, наприклад, певний рецептор/ензим, створюється віртуальна бібліотека з великою кількістю різноманітних сполук. Після цього, власне, і стартує віртуальний скринінг. Основними мішенями для існуючих лікарських засобів є клітинні та ядерні рецептори, ферменти, гормони та клітинні/тканинні фактори, іонні канали, ДНК [27, 28].

Методологія віртуального скринінгу включає ряд етапів відсіву сполук за різними критеріями. Очевидно, що виділення етапів віртувального скринінгу є умовним і включає різні варіанти їх комбінацій та черговості. Розглянемо спрощений приклад етапів процедури віртуального скринінгу.

1. REOS (Rapid Elimination Of Swill) – це початковий крок комп'ютерного відбору, який включає відсів абсолютно непридатних речовин. За допомогою цього методу відкидаються сполуки, що не можуть існувати фізично, містять токсикофори, хімічно та фармакологічно несумісні угрупування і не мають в своїй структурі жодного фармакофору або біологічно активного фрагменту. Такий варіант відбору є актуальним тільки для т. з. загальних (незфокусованих) бібліотек (див. вище). Слід відзначити, що для досягнення кардинального зменшення об'єму бібліотеки при відборі REOS використовують кілька припущень, які дозволяють значно скоротити поле пошуку. Наприклад, при необхідності створення сфокусованої лікоподібної бібліотеки (drug-like library), внесення речовин у бібліотеку потрібно проводити на основі аналогії з сучасними ЛЗ, фармакофорною теорією тощо [28, 29]. Оскільки простір пошуку є дуже великим, потрібно уникнути пастки повного перелічування віртуальної бази даних. Для виходу з названої ситуації використовують поняття сполуки-лідера (див. нижче) і відповідно до її структури проводять відбір. Якщо ж структура речовини-лідера невідома, тоді проводять фармакологічний скринінг випадкової вибірки речовин з бази, найбільш активні сполуки приймають як сполуки-лідери та проводять відбір відносно їх структури.

2. Оцінка подібності структури. Наступним кроком віртуального скринінгу може бути оцінка подібності структури (наприклад, 2D подібності) до існуючих ліків або біологічно активних речовин. При опрацюванні 2D-структури оцінюється наявність фармакофорів згідно з фармакофорною теорією. Для проведення цього процесу використовуються спеціальні комп'ютерні програми. Так, CONJURE (Vertex Pharmaceuticals) здатна обробити до 100000 речовин за годину на одній робочій станції. Крім цього, при 2D-скринінгу відбувається перевірка на 2D-подібність, при якій сполуки бібліотеки, що пройшли попередній відсів, порівнюються із структурою сполуки-лідера (якщо вона була попередньо встановлена). Варто зазначити, що REOS і 2D-скринінг є практично незалежними одне від одного, тому вони можуть проводитися як в зазначеному порядку (REOS – 2D), так і навпаки. Ілюстративним прикладом може служити російська розробка – PASS C&T (Prof. V. Poroikov http://www.pharmaexpert.ru/passonline/) [30].

3. Оцінка 3D конформацій. Молекулярний докінг. На цьому етапі віртуального скринінгу створюються об'ємні конформації речовин (власне молекулярне моделювання) для порівняння зі структурою рецепторів, на які повинен впливати ЛЗ. Спочатку моделюється тривимірна структура рецептора, потім – тривимірна структура речовин бази, після чого проводять 3D-скринінг (порівняння структур). Особливістю названого етапу є те, що кількістть кандидатів не зменшується, а збільшується внаслідок моделювання можливих енантіо- та конформерів. Також на цьому етапі використовують поняття подібності та різноманітності (similarity and diversity), тобто, практично ідентичні за 3D-структурою сполуки (відмінний лише один замісник або речовина, як ліганд, в об'ємному відношенні еквівалентна іншим сполукам) відсіюються з віртуальної бібліотеки при надто великому її об'ємі (т. з. pooling). Ілюстративним підходом цього етапу є *молекулярний докінг* – розрахункова процедура суміщення тривимірної структури досліджуваної сполуки/сполук з активним центром мішені для встановлення стійкості комплексу ліганд-мішень, а отже розрахунку значення афінності ліганду. Докінг може проводитись при наявності інформації про структуру рецептора-мішені, а також його активного центру [31] (табл. 2). Як джерела даних щодо

Таблиця 2

Програмне забезпечення для молекулярного докінгу

Програмне забезпечення	Застосування	WWW
DOCK®	Протеїн-ліганд докінг, протеїн-протеїн докінг, протеїн-нуклеїнова кислота докінг, structure-based дизайн [33]	http://dock.compbio.ucsf.edu/
AutoDock®	Протеїн-ліганд докінг, дизайн комбінаторної бібліотеки, structure-based дизайн	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock
FlexX®	Протеїн-ліганд докінг, structure-based дизайн	http://www.biosolveit.de/FlexX/ http://www.tripos.com
GOLD®	Протеїн-ліганд, ДНК(РНК)-ліганд, structure-based дизайн	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
Glide®	Протеїн-ліганд докінг, віртуальний скринінг, прогнозування виду зв'язування, structure-based дизайн	http://www.philscience.com/schrodinger/Glide.htm
FRED®	Протеїн-ліганд докінг, прогнозування виду зв'язування	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
ICM®	Протеїн-ліганд докінг, протеїн-протеїн докінг, structure-based дизайн	http://www.molsoft.com/docking.html

структури останніх найчастіше використовується Protein Data Bank (http://www.rcsb.org).

Загальна методологія проведення скринінгу з використанням докінгових досліджень, як правило, включає: *i*) підготовку бази сполук (вибір бібліотеки, протонування (імітація фізіологічного pH), конвертування в 3D); *ii*) вибір структури мішені (кристалографічна модель, ЯМР або гомологічна модель); *iii*) «фільтрування» бібліотеки (наприклад, правила Ліпінського, фармакофорні моделі тощо); *iv*) визначення місця зв'язування (місце зв'язування ліганду з каталітичним центром, місця білок-білкових взаємодій); *v*) докінг для передбачення конформації та орієнтації ліганду в місці зв'язування; *vi*) скоринг, для оцінки енергії взаємодії між мішенню і лігандом; *vii*) проведення дослідження біологічної активності сполук-лідерів; *viii*) кореляція скорингових та експериментальних даних; *ix*) ключова оптимізація.

4. Розрахункова стадія. На цьому етапі віртуального скринінгу обчислюються фізико-хімічні властивості речовин, хімічна активність, токсичність, оцінюються прогнозовані значення фармакокінетичних параметрів. Після прогнозування відсіюють речовини з незадовільними значеннями названих параметрів. Враховуючи необхідність прогнозування токсичності сполук на ранніх стадіях розробки ЛЗ, розроблено ряд методів оцінки цього важливого параметра. Так, ряд експертних систем працює на основі взаємозв'язку структура – активність/токсичність. Зокрема, для створення моделей структура-LD_{50} використовують пакети DEREK, OncoLogic. Інші системи побудовані на базі математичних і статистичних (метод QSAR в програмах TOPKAT, dbToxPre) або індуктивних (програма MultiCASE/CASE) моделей**.** Стратегія віртуального скринінгу на розрахунковому етапі часто використовує QSAR аналіз (Quantitative Structure-Activity Relationships – кількісний взаємозв'язок між структурою та активністю) – виявлення залежності між фармакологічною дією сполук і їх фізико-хімічними властивостями в певній групі речовин і опис її рівнянням [33, 34]. QSAR методологія характеризується широким впровадженням математичних методів для встановлення співвідношення між заданим видом активності органічних сполук і їх структурою у вигляді $A = fS$ (*A* – активність, *S* – структура представлена значеннями молекулярних дескрипторів, чисельних характеристик, які виражають структурні властивості молекули). У зв'язку з цим головна проблема QSAR полягає у виборі (бажано мінімального) набору дескрипторів, достатнього для опису заданої властивості. Одним із джерел дескрипторів є методи квантової хімії, що дозволять проводити розрахунки електронної структури і геометрії найрізноманітніших хімічних систем аж до моделювання ефектів середовища і взаємодії молекули з рецептором. З цією метою, одночасно з добре відомим *регресійним аналізом* застосовуються методи, пов'язані з класифікацією молекул за різноманітними класами активності. Особливе значення мають *факторні методи*. Одним із варіантів факторного аналізу є метод головних компонент – статистичний підхід, що дозволяє проаналізувати структуру взаємозв'язку елементів дескрипторного набору і, що дуже суттєво, зменшити його.

Термін «лікоподібність» (drug-like properties) останнім часом став звичним поняттям для фармації і, як правило, відображає прості фізико-хімічні та структурні властивості (молекулярні дескриптори), характерні для успішних лікарських засобів. Одними з найвідоміших лікоподібних ха-

рактеристик є правила Ліпінського (правило п'яти), які мають наступний вигляд: *i*) LogP≤5; *ii*) молекулярна маса ≤500; *iii*) здатність бути акцептором протону ≤10; *iv*) здатність бути донором протону ≤5; *v*) обертання зв'язків ≤8 [35-37]. Параметри *iii* та *iv* вказують на здатність сполуки утворювати зв'язки на «відповідній» ділянці біомолекули, параметр *v* характеризує «жорсткість» структури і вказує на об'єм речовини. Таким чином, названі критерії характеризують загальні особливості хімічної структури потенційного ЛЗ, враховуючи сорбцію, розподіл в організмі, метаболізм, елімінацію. Однак, слід відмітити, що ці правила були розроблені на основі пероральних ЛЗ, відповідно, кандидати в лікарські засоби для інших шляхів введення (довенний, внутрішньом'язовий, інгаляційний та ін.) потребують інших критеріїв оцінки лікоподібності. Тому відомі інші правила лікоподібності. Наприклад, Вебер та ін. [38] встановили, що більшість сполук з доброю пероральною біодоступністю мали менше, ніж 10 зв'язків, що обертаються (rotatable bonds), та площу полярної поверхні (polar surface area (PSA)) менше, ніж 140 Å^2. Хьюз та співавт. показали, що сполуки із значеннями logP меншими, ніж 3 та PSA більше, ніж 75 Å^2 у 6 разів рідше спричиняють побічні реакції у *in vivo* дослідженнях толерантності, ніж сполуки, що не відповідали цим критеріям [39]; Ловерінг та колеги [40] доводять, що існує взаємозв'язок між т. з. «плоскістю» молекули, що залежить від кількості sp^3 гібридизованих атомів карбону, та ймовірністю її потрапляння до сполук-лідерів при пошуку ЛЗ.

Віртуальний скринінг не є 100% надійним методом пошуку нових ЛЗ, оскільки не завжди можна передбачити фізичні, хімічні та біологічні властивості сполук на основі їх структури. На етапі віртуального скринінгу багато активних сполук можуть бути відкинуті і не взяті до уваги, проте цей підхід є гідною спробою систематизувати принципи дії ЛЗ і оптимізувати оцінку великих баз речовин. У контексті вищеокреслених проблем актуальними є переваги *фрагмент-орієнтованого конструювання* ЛЗ (fragment-oriented drug design) [41]. Парадоксально, але фрагмент-орієнтований дизайн базується на скринінгу меншої кількості сполук (декілька тисяч) з метою пошуку низькоафінних фрагментів (із значеннями K_d в мікро- та мілімолярному діапазоні). На противагу загальноприйнятий фармакологічний скринінг намагається охопити якнайбільше сполук (як правило, мільйон чи більше) з метою пошуку потенційних сполук-лідерів (із значеннями K_d нижчими, ніж 1 μM). Проте, припускаючи, що розмір «хімічного всесвіту» знаходиться в межах 10^{60}, скринінг 10^6 сполук (що представляє досить велику локальну вибірку) ледве охоплює якусь частину доступного хімічного простору. Ще однією проблемою «звичайного» скринінгу є факт, що велика частина більшості хімічних бібліотек включає сполуки, оптимізовані для відомих мішеней, що в майбутньому обмежує хімічне розмаїття бібліотек і, як наслідок, зменшує шанси виявлення нових сполук-лідерів. На противагу ймовірна кількість існуючих хімічних фрагментів є на багато порядків меншою – сполук із молекулярною масою меншою, ніж 160 Da є приблизно 14 мільйонів. Отже, скринінг фрагментної бібліотеки із 10000 сполук охоплює значно більший хімічно диверсифікований простір, ніж звичайний високоефективний фармакологічний скринінг. З іншого боку, структурно простіші молекули характеризуються вищою ймовірністю реалізації рівня зв'язування з біомакромолекулами (hit rates). Високі hit rates у цьому випадку є не лише наслідком просто вищих концентрацій, але й відображають ширше охоплення хімічного диверсифікованого простору. Отже, дослідження фрагментів (менших і структурно простіших молекул) у багатьох випадках може бути найкоротшим шляхом для досягнення балансу між потенційною біологічною активністю та оптимальними фармакокінетичними властивостями [41].

Таким чином, очікуваним результатом всіх вищенаведених методів та алгоритмів пошуку нових біологічно активних сполук є отримання так званої «сполуки-лідера». *Сполука-лідер (lead-compound)* – це «структурний прототип» майбутнього ЛЗ, що характеризується визначеною фізіологічною активністю, на базі якої і буде створюватися препарат. Сполука-лідер повинна володіти бажаною біологічною активністю та бути придатною для подальшої структурної оптимізації. Крім того, сполука-лідер не повинна бути дуже полярною чи ліпофільною (для уникнення проблеми з біодоступністю), не містити токсикофори чи групи, що можуть утворювати токсичні метаболіти, а також не повинна незворотньо (ковалентно) реагувати з біологічною мішенню. Оптимізація структури-лідера є еволюційним процесом. Будь-які суттєві чи незначні покращення властивостей молекули призводять до нових аналогів, які оптимізуються до отримання кандидата на лікарський засіб [37, 42].

Сполуки-лідери можуть бути отримані не тільки в процесі віртуального чи високоефективного фармакологічного скринінгу. Одними з найбагатших джерел біологічно активних сполук залишаються речовини природнього походження, причому мова йде не тільки про рослинну сировину, але й про мікроорганізми, що можуть бути продуцентами як антибіотиків, так і інших класів ЛЗ. Підтвердженням цього є «класичні» приклади – серцеві глікозиди з роду наперстянки; мор-

фін – сполука-лідер для створення аналгетиків, протикашльових засобів, антагоністів морфіну, антидіарейних засобів та нейролептиків; саліцилова кислота володіє слабкою протизапальною дією, а її похідне ацетилсаліцилова кислота є незворотнім інгібітором циклооксигенази та використовується для профілактики тромбозів. До інших прикладів сполук-лідерів рослинного походження можна віднести алкалоїди кураре, папаверин, атропін, кокаїн. Крім речовин рослинного походження багатим джерелом лікарських засобів є ендогенні нейромедіатори. Майже кожна модифікація дофаміну, серотоніну, гістаміну та ацетилхоліну приводила до отримання сполук із зміненою активністю та селективністю, які часто ставали кандидатами на ЛЗ. Ряд ЛЗ був отриманий під час вивчення біохімічних механізмів (наприклад, дії гормонів – синтетичні кортикостероїди, комбінація естро- та гестагенів у протизаплідних ЛЗ), «копіювання» існуючих лікарських засобів із незначними хімічними модифікаціями (створення ліків-клонів – що отримало назву me too). Часто такі аналоги можуть мати суттєві терапевтичні переваги, наприклад, стійкі до дії β-лактамази пеніциліни, діуретичні і протидіабетичні сульфаніламіди, полярні H_1-антигістамінні препарати без седативного ефекту тощо. Активно використовуються як джерела інноваційних ЛЗ вже впроваджені на ринок препарати, як наслідок, встановлюється можливість інших аспектів використання (наприклад, загаданий силденафіл – див. вище) [37].

Наведений перелік підходів та методів, що на сьогодні є домінантними у створенні інноваційних ЛЗ, є предметом постійного зацікавлення наукової спільноти. Окрім того, більшість основних моментів є інтегрованими в навчальні курси студентів-фармацевтів (на рівні PharmD та MS) в рамках дисципліни Медична хімія (Medicinal Chemistry) [5] та представлені в авторитетних підручниках [4, 6, 7, 43]. На жаль, в умовах сьогодення українські студенти-фармацевти недостатньо ознайомлені з загальносвітовими тенденціями фармацевтичної галузі. Максимально наближеним (з формальної точки зору) до згаданого курсу Медичної хімії є Фармацевтична хімія, проте реалії свідчать про необхідність її реформування. Як спроба такого реформування та гармонізації освітніх програм, є запроваджений нами курс «Комп'ютерні технології у фармації» (для студентів 4-го курсу) [44-48], який дає можливість вивчення загальних підходів сучасного drug design.

Література

1. *Cain J., Romanelli F. Current Pharmacy Teaching and Learning, 2009, Vol. 1(2), pp.66-70. doi: 10.1016/j.cptl.2009.10.001.*
2. *Rowland M., Noe C. R., Smith D. A., Tucker G. T., Crommelin D. J., Peck C. C., Rocci M. L. Jr., Besançon L., Shah V. P. Journal of Pharmaceutical Science, 2012, Vol. 101, No.11, pp.4075-4099. doi: 10.1002/jps.23295.*
3. *Kinch M. S., Haynesworth A., Kinch S. L., Hoyer D. Drug Discovery Today, 2014, Vol. 19, No.8, pp.1033-1039. doi:10.1016/j.drudis.2014.03.018.*
4. *Patrick G. L. An introduction to medicinal chemistry. 5th ed. – New York: Oxford University Press, 2013, 816 p. ISBN: 9780199697397.*
5. *Khan M. O., Deimling M. J., Philip A. American Journal of Pharmaceutical Education, 2011, Vol. 75, No.8, art.161. doi:10.5688/ajpe758161.*
6. *Abraham D. J. Burger's medicinal chemistry and drug discovery, Vol. 1, Drug discovery. 6th ed. – New Jersey: Wiley, 2003, 932 p. ISBN: 0471270903.*
7. *Abraham D. J. Burger's medicinal chemistry and drug discovery, Vol. 2, Drug discovery and drug development. 6th ed. – New Jersey: Wiley, 2003, 808 p. ISBN: 047370282.*
8. *Richon A. B. A. Scrolling history of computational chemistry. http://www.netsci.org/Science/Compchem/feature17b.html.*
9. *Camille G. W. Journal of Medicinal Chemistry, 2004, Vol. 47, No.6, pp.1303-1314. doi:10.1021/jm030480f.*
10. *Kaminskyy D., Bednarczyk-Cwynar B., Vasylenko O., Kazakova O., Zimenkovsky B., Zaprutko L., Lesyk R. Medicinal Chemistry Research, 2012, Vol. 21, No.11, pp.3568-3580. doi:10.1007/s00044-011-9893-9.*
11. *Fortin S., Bérubé G. Expert Opinion on Drug Discovery, 2013, Vol. 8, No.8, pp.1029-1047. doi:10.1517/17460441.2013.798296.*
12. *Meunier B. Accounts of chemical research, 2007, Vol. 41, No.1, pp.69-77. doi:10.1021/ar7000843.*
13. *De-Simone R. W., Currie K. S., Mitchell S. A., Darrow J. W., Pippin D. A. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2004, Vol. 7, No.5, pp.473-493. doi:10.2174/1386207043328544.*
14. *Lesyk R. B., Zimenkovsky B. S., Kaminskyy D. V., Kryshchyshyn A. P., Havryluk D. Y., Atamanyuk D. V., Khyluk D. V. Biopolymers and Cell, 2011, Vol. 27, No.2, pp.107-117. doi:10.7124/bc.000089.*
15. *Rautio J., Kumpulainen H., Heimbach T., Oliyai R., Oh D., Järvinen T., Savolainen J. Nature Reviews Drug Discovery, 2008, Vol. 7, No.3, pp.255-270. doi: 10.1038/nrd2468.*
16. *Ettmayer P., Amidon G. L., Clement B., Testa B. Journal of Medicinal Chemistry, 2004, Vol. 47, No.10, pp.2393-2404. doi:10.1021/jm0303812.*
17. *Nicholas B., Buchwald P. Medicinal Research Reviews, 2000, Vol. 20, No.1, pp.58-101. doi: 0.1002/(SICI)1098-1128(200001)20:1<58::AID-MED3>3.0.CO;2-X.*
18. *Contreras J-M., Bourguignon J-J. In The Practice of Medicinal Chemistry. 2nd ed., ed. C. G. Wermuth. – London: Academic press, 2003, pp.251-273. doi: 10.1016/B978-012744481-9/50020-9.*
19. *Bolger R. Drug Discovery Today, 1999, Vol. 4, No.6, pp.251-253. doi:10.1016/S1359-6446(99)01356-2.*
20. *Juan A., Shoichet B. Eds. Virtual screening in drug discovery. – Boca Raton: CRC press, 2005, 496 p. ISBN 9781420028775.*
21. *Fenniri H. Ed. Combinatorial chemistry a practical approach – New York: Oxford University Press, 2000, 516 p. ISBN 9780199637546.*
22. *Lehn J. M. Chemistry-A European Journal, 1991, Vol. 5, No.9, pp.2455-2463. doi:10.1002/(SICI)1521-3765(19990903)5:9<2455::AID-CHEM2455>3.0.CO;2-H.*
23. *Ghose A. K., Viswanadhan V. N., Wendoloski J. J. Journal of Combinatorial Chemistry, 1991, Vol. 1, No.1, pp.55-68.doi:10.1021/cc9800071.*
24. *Janzen W. P., Bernasconi P. Eds. High throughput screening: methods and protocols (Methods in molecular biology, Vol. 190). – Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2002, 265 p. ISBN: 9780896038899. doi:10.1385/1592591809.*
25. *Tetko I. V. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2003, Vol. 3, No.8, pp.809-820. doi:10.2174/1389557033487638.*
26. *Sams-Dodd F. Drug Discovery Today, 2005, Vol. 10, No.2, pp.139-147. doi:10.1016/S1359-6446(04)03316-1.*
27. *Shoichet B. K. Nature, 2004, Vol. 432(7019), pp.862-865. doi:10.1038/nature03197.*
28. *Walters W. P., Stahl M. T., Murcko M. A. Drug Discovery Today, 1998, Vol. 3, No.4, pp.160-178. doi:10.1016/S1359-6446(97)01163-X.*
29. *Walters W. P., Namchuk M. Nature Reviews Drug Discovery, 2003, Vol. 2, No.4, pp.259-266. doi:10.1038/nrd1063.*

30. *Filimonov D. A., Lagunin A. A., Gloriozova T. A., Rudik A. V., Druzhilovskii D. S., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2004,Vol. 50 No.3, pp.1-14. doi:10.1007/s10593-014-1496-1.*
31. *Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J. Nature Reviews Drug discovery, 2004, Vol. 3, No.11, pp.935-949. doi:10.1038/nrd1549.*
32. *Lyne P. D. Drug Discovery Today, 2002, Vol. 7(20), pp.1047-1055. doi:10.1016/S1359-6446(02)02483-2.*
33. *Puzyn T., Leszczynski J., Cronin M. T. Eds. Recent advances in QSAR studies. Methods and applications. Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics, 2010, Vol. 8, 432 p. doi:10.1007/978-1-4020-9783-6.*
34. *Kubinyi H. Drug Discovery Today, 1997, Vol. 2(11), pp.457-467. doi:10.1016/S1359-6446(97)01079-9.*
35. *Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. Vol. 64, pp.4-17. doi:10.1016/j.addr.2012.09.019.*
36. *Lipinski C. A. Drug Discovery Today: Technologies, 2004, Vol. 1(4), pp.337-341. doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.007.*
37. *Borchardt R., Kerns E., Hageman M., Thakker D., Stevens J. Eds. Optimizing the "drug-like" Properties of Leads in Drug Discovery, Vol. 4. – New York: Springer, 2007, 511 p. ISBN: 978-0-387-34056-2. doi:10.1007/978-0-387-44961-6.*
38. *Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H. Y., Smith B. R., Ward K. W., Kopple K. D. Journal of Medicinal Chemistry, 2002, Vol. 45, No.12, pp.2615-2623. doi:10.1021/jm020017n.*
39. *Hughes J. D., Blagg J., Price D. A., Bailey S., DeCrescenzo G. A., Devraj R. V., Zhang Y. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008, Vol. 18, No.17, pp.4872-4875. doi:10.1016/j.bmcl.2008.07.071.*
40. *Lovering F., Bikker J., Humblet C. Journal of Medicinal chemistry, 2009, Vol. 52(21), pp.6752-6756. doi:10.1021/jm901241e.*
41. *Hajduk P. J., Greer J. Nature Reviews Drug Discovery, 2007, Vol. 6(3), pp.211-219. doi 10.1038/nrd2220.*
42. *Kubinyi H. In search for new leads. In: EFMC – Yearbook 2003. 2004: pp.14-28. (Also published in Rossiiskii Khimicheskii Zhurnal (Rus. Chem. J.). 2006; Vol. 50(2), pp.5-17. (in Russian).*
43. *Beale J. M., Block J. H. Jr. Eds. Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical chemistry. 12th ed. –New York: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, 2011, 1010 p. ISBN 978-0-7817-7929-6.*
44. *Lesyk R. B., Gromovyk B. P., Atamanyuk D. V., Subtel'na I. Yu., Soronovych I. I. Farmaceutychnyj Zhurnal – Pharmaceutical Journal, 2002, No.2, pp.33-39. (In Ukrainian).*
45. *Zimenkovsky B. S., Kryshchyshyn A. P., Kaminskyy D. V., Lesyk R. B. Abstract book of Ukrainian conference "New Level of the Credit and Module System of the educational processes organization in the Medical(Pharmaceutical) Universities" 18-19 April 2013, Ternopil, pp.305. (In Ukrainian).*
46. *Zimenkovsky B. S., Lesyk R. B., Kaminskyy D. V., Kryshchyshyn A. P., Atamanyuk V. V. Computer technology in pharmacy. Tutorials for 4th course students. – Lviv: LNMU, 2013, 66p. (In Ukrainian).*
47. *Kovalenko S. I., Lesyk R. B., Belienichev I. F. Medychna Osvita – Medical education, 2004, No.4, pp.27-30. (In Ukrainian). http://217.196.164.19/data/kafedra/journals/education/2004_2/all.pdf#page=27.*
48. *Lesyk R. B., Muzychenko V. P., Kazmirchuk H. V., Sementsiv H. M., Yaroshchuk S. M., Gnidets V. I. Medychna Osvita – Medical education, 2004, No.4, pp.24-26. (In Ukrainian). http://217.196.164.19/data/kafedra/journals/education/2004_2/all.pdf#page=24.*

Надійшла до редакції 30.01.2015 р.

УДК 615.038:579.873.21:547.823/824

НОВІ ПОХІДНІ ГІДРАЗИДУ ІЗОНІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНІ ЗАСОБИ

Н.Б.Гончаренко, В.В.Благодатний*, В.В.Ковалішин**, І.М.Коперник**, О.П.Козаченко**, В.С.Броварець**, Л.О.Метелиця**

Клініко-діагностична лабораторія, Територіальне медичне об'єднання «Фтизіатрія», м. Київ
* Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика
** Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України
02660, м. Київ, вул. Мурманська, 5. E-mail: kopernik1@ua.fm

Ключові слова: QSAR; Mycobacterium tuberculosis; H37RV; HR; похідні ізоніазиду

Поява мультирезистентних штамів мікобактерії туберкульозу (Mtb) є стимулом до пошуку нових ефективних лікарських засобів. Незважаючи на появу сучасних протитуберкульозних препаратів, ізоніазид є ключовим та найбільш ефективним компонентом для всіх мультитерапевтичних схем лікування, рекомендованих ВООЗ. Описаний QSAR дизайн, синтез та оцінка in vitro протитуберкульозної активності ряду потенційних похідних ізоніазиду відносно штаму Mtb H37Rv та мультирезистентного штаму (HR). QSAR методологія була застосована з використанням штучних нейронних мереж. Прогнозуюча здатність регресійних моделей оцінювалася за допомогою методу ковзного аналізу та коефіцієнта перехресної оцінки q^2. За допомогою розробленої QSAR моделі проведено оцінку інгібіторної активності 440 віртуальних сполук проти Mtb, сім похідних ізоніазиду відібрано та синтезовано. У біологічних дослідженнях використано мультирезистентний штам Mtb, стійкий до ізоніазиду та рифампіцину. Усі синтезовані сполуки з високою передбаченою активністю продемонстрували антимікобактеріальний ефект по відношенню до штаму Mtb H37Rv. «Сполука-лідер» N1-(3-нітрофенілметиліден)-піридин-4-карбогідразид, що виявила активність відносно мультирезистентного штаму Mtb (HR), є об'єктом подальших досліджень як потенційний антимікобактеріальний агент.

NEW DERIVATIVES OF ISONICOTINIC ACID HYDRASIDE AS POTENTIAL ANTITUBERCULAR AGENTS
N.B.Goncharenko, V.V.Blagodatnyi, V.V.Kovalishyn, I.M.Kopernyk, O.P.Kozachenko, V.S.Brovarets, L.O.Metelytsia
Key words**:** *QSAR; Mycobacterium tuberculosis; H37RV; HR; isoniazide derivatives*
The appearance of multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) is a stimulus for searching new and efficient antitubercular drugs. Despite the appearance of new antitubercular drugs, isoniazid is still the key and most effective component in all multitherapeutic regimens recommended by the WHO. This paper describes the QSAR design, synthesis and in vitro evaluation of the antitubercular activity of several potent isoniazid derivatives against Mtb strain (H37Rv) and resistant strain (HR). The QSAR method was applied using Artificial Neural Networks. The predictive ability of the regression model was estimated through leave-one-out cross-validation coefficient q^2. The inhibition activities of 440 virtual compounds against Mtb were evaluated by the QSAR model developed, and seven isoniazid derivatives were selected and synthesized. In the biological research the multidrug-resistant strain of Mtb with resistance to isoniazid and rifampicin was used. All compounds synthesized with the predicted high activity showed antimycobacterial activity against Mtb strain H37Rv. "The compound-leader" – N^1-(3-nitrophenylmethylidene)-pyridine-4-karbohidrazide revealing the activity against multiresistant strain (HR) of Mtb is identified as an original object for further research as an potential antimycobacterial agent.

НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ГИДРАЗИДА ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ СРЕДСТВА
Н.Б.Гончаренко, В.В.Благодатный, В.В.Ковалишин, И.Н.Коперник, О.П.Козаченко, В.С.Броварец, Л.А.Метелица
Ключевые слова: *QSAR; Mycobacterium tuberculosis; H37RV; HR; производные изониазида*
Появление мультирезистентных штаммов микобактерии туберкулеза (Mtb) является стимулом для поиска новых эффективных лекарственных средств. Несмотря на появление современных противотуберкулезных препаратов, изониазид является ключевым и наиболее эффективным компонентом для всех мультитерапевтических схем лечения, рекомендованных ВОЗ. Эта статья описывает QSAR дизайн, синтез и оценку in vitro противотуберкулезной активности ряда потенциальных производных изониазида против штамма H37Rv и мультирезистентного штамма Mtb. QSAR методология была использована с применением искусственных нейронных сетей. Прогнозирующая способность регрессионных моделей оценивалась с помощью метода скользящего анализа и коэффициента перекрестной оценки q^2. С помощью разработанной QSAR модели была проведена оценка ингибиторной активности 440 виртуальных соединений против Mtb, семь производных изониазида отобрано и синтезировано. В биологических исследованиях использовали мультирезистентный штамм Mtb, устойчивый к изониазиду и рифампицину. Все синтезированные соединения с высокой прогнозируемой активностью продемонстрировали антимикобактериальный эффект относительно штамма Mtb H37Rv. «Соединение-лидер» N1- (3-нитрофенилметилиден)-пиридин-4-карбогидразид, проявившее активность относительно мультирезистентного штамма Mtb (HR), является объектом дальнейших исследований в качестве потенциального антимикобактериального агента.

Відомо, що характерною особливістю штамів *Mycobacterium tuberculosis* вважається їх надзвичайна мінливість та особливості структури клітинної оболонки, завдяки чому вони здатні швидко пристосовуватися до антибактеріальних препаратів. Складна будова клітинної мембрани мікобактерій є не тільки перешкодою для проникнення терапевтичних засобів, але й створює умови для існування цих мікроорганізмів у латентній формі та формує їх резистентність [1, 2]. Щільний зв'язок міколових кислот з арабіногалактаном та пептидогліканом клітинної стінки мікобактерій забезпечують її наднизьку проникність, а ацильовані трегалози, відомі як корд-фактори або фактори вірулентності, індукують на її поверхні експресію цитокінів [3, 4].

Особливу небезпеку представляють мультирезистентні штами *M. tuberculosis*, що є стійкими одночасно до декількох лікарських засобів [5]. Інфекції, викликані такими штамами, мають гостро прогресуючий характер та погано піддаються лікуванню існуючими препаратами.

Зважаючи на те, що за останні 30 років не з'явилося жодного нового протитуберкульозного препарату з новим механізмом дії [6], пошук високоефективних антимікобактеріальних засобів є актуальним завданням сучасної фармацевтики та біоорганічної хімії.

Відомо, що за класифікацією протитуберкульозних препаратів Міжнародного союзу боротьби з туберкульозом до препаратів з високою ефективністю (1 група) відноситься ізоніазид як найбільш ефективний з препаратів гидразиду ізонікотинової кислоти при будь-якій формі та локалізації активного туберкульозу як у дорослих, так і у дітей [7].

Мета роботи – QSAR прогнозування та вивчення антимікобактеріальної активності нових сполук групи ізоніазиду проти культури штамів *Mycobacterium tuberculosis.*

Дана робота є продовженням досліджень, описаних у попередніх публікаціях [8, 9].

Матеріали та методи

QSAR моделювання. Використана у роботі база даних сполук складалася з похідних ізоніазиду – інгібіторів *M. tuberculosis* (для штаму H37Rv)[9]. Активність сполук оцінювали за величиною МІК (мінімальна інгібуюча концентрація), яка варіювалася від 0,00328 до 2800,34 мкМ. Кожну молекулу моделювали за допомогою програми Chemaxon Standardizer [10]. 3D структури оптимізували за допомогою програми Chemaxon Standardizer та зберігали у SDF форматі. Дескриптори розраховували за програмою DRAGON [11]. Антимікобактеріальну активність зумовлював набір, сформований з найбільш значимих дескрипторів (1192 дескриптори).

Для побудови прогнозуючих QSAR моделей використовували метод асоціативних штучних нейронних мереж (ASNN-Associative Neural Networks) [12, 13]. Якість всіх моделей оцінювали за допомогою методу ковзного контролю (МКК, leave-one-out, LOO) [14].

Прогнозуючу здатність регресійних моделей оцінювали за допомогою коефіцієнта перехресної оцінки q^2, запропонованого Крамером та ін. [15].

$$q^2 = 1 - \sum_{i=1}^{N}(O_i - Y_i)^2 \Big/ \sum_{i=1}^{N}(Y_i - Y_{mean})^2, \qquad (1)$$

де: O_i – розрахунковий вектор активності молекули *i*; Y_i – цільовий вектор активності молекули *i*; Y_{mean} – середнє значення Y_i; *N* – кількість сполук.

Біологічні дослідження. При вивченні протитуберкульозної активності похідних ізоніазиду використовували «класичний» штам *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) та мультирезистентний штам (HR) зі стійкістю до ізоніазиду та рифампіцину.

Експериментальна частина

QSAR модель було розроблено виключно на основі навчального набору, а її якість підтверджено шляхом прогнозування інгібіторної активності сполук з тестового набору даних [16]. Процес навчання ASNN проводили на наборі даних 400 сполук. Для тестування QSAR моделі використовували 184 сполуки. Після побудови загальної моделі (на основі всіх 1192 дескрипторів) за допомогою методів відбору дескрипторів [17, 18] створено QSAR модель на основі 62 дескрипторів. Точність прогнозу, отримана для навчальної вибірки даних, складала $q^2 = 0,77 \pm 0,01$, тоді як для тестового набору $q^2 = 0,71 \pm 0,01$.

На рисунку графічно представлене співвідношення експериментально отриманого значення –lg(МІК) до його передбаченого значення для навчального та тестового наборів даних.

Як видно з рисунка, для сполук з тестового набору різниця між експериментальним та передбаченим значеннями активності лежить в межах 1-2 lg(МІК). Для решти сполук з тестового набору (174 з 184) різниця між експериментальним та передбаченим значеннями активності лежить у межах 1 lg(МІК), що свідчить про високу прогнозуючу здатність розробленої QSAR моделі.

Віртуальний набір з 440 сполук, що були частково досліджені у попередній роботі [8], проаналізовано за допомогою розробленої нами QSAR моделі. Інгібіторна активність всіх сполук була передбачена в межах 1,7-3,7 мкМ, що свідчить про приблизно однакову активність сполук проти штаму *H37Rv M. tuberculosis*. Сполуки **1**-**7** з найвищою передбаченою активністю відібрано для синтезу та подальшого біологічного тестування. Син-

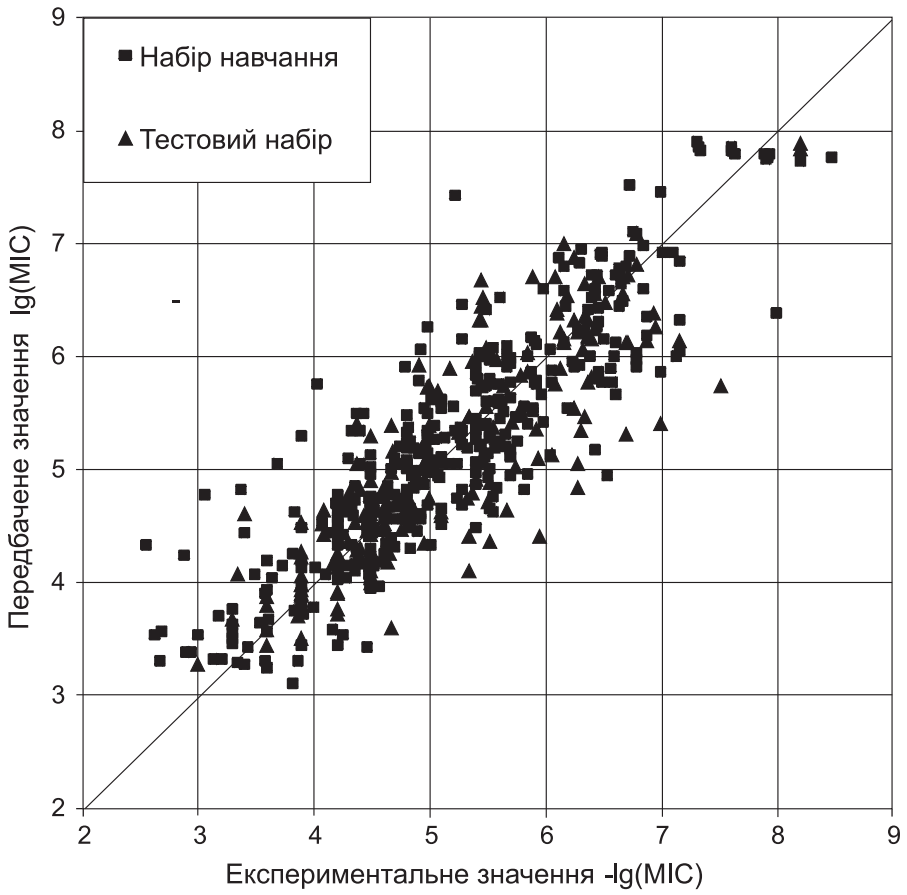
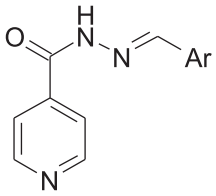


Рис. Співвідношення експериментально отриманого значення –lg(MIK) до його передбаченого значення для навчального та тестового наборів даних.



1-7

Ar = 4-EtC_6H_4 (**1**); 3-$O_2N$$C_6H_4$ (**2**); 3-H(O)CC_6H_4 (**3**); 4-H(O)CC_6H_4(**4**); 4-MeO(O)CC_6H_4 (**5**); 2-MeC_6H_4 (**6**); 3-MeC_6H_4 (**7**)

Схема

тез сполук **1-7** проводили за відомими методами [19, 20, 21, 22] (схема).

Культивування штамів *Mycobacterium tuberculosis* проводили на стандартному поживному середовищі Левенштейна-Йєнсена методом пропорцій за Канетті [23]. Суспензію культури стандартизували за бактеріальним стандартом мутності (1 McF). Інкубацію бактеріальної суспензії проводили впродовж 6 тижнів при температурі +37°С.

Результати дослідження протитуберкульозної активності синтезованих сполук представлено в таблиці.

Дані таблиці свідчать, що синтезовані похідні ізоніазиду виявили активність як по відношен-

Таблиця

QSAR прогноз та антимікобактеріальна активність похідних ізоніазиду

Сполука	Чинна концентрація сполуки, М	Прогноз інгібіторної активності, lg(MIK)	Чутливість досліджених штамів *M. tuberculosis* до дії сполук	
			H37Rv	HR
1	$5\cdot10^{-4}$ $5\cdot10^{-5}$	-6,33	Ч Ч	Ч Ч*
2	$5\cdot10^{-4}$ $5\cdot10^{-5}$	-6,41	Ч Ч	Ч Ч
3	$5\cdot10^{-4}$ $5\cdot10^{-5}$	-6,38	Ч Ч	Ч Ч*
4	$5\cdot10^{-4}$ $5\cdot10^{-5}$	-6,57	Ч Ч	Ч Ч*
5	$5\cdot10^{-4}$ $5\cdot10^{-5}$	-6,38	Ч Ч	Р Р
6	$5\cdot10^{-4}$ $5\cdot10^{-5}$	-6,24	Ч Ч	Р Р
7	$5\cdot10^{-4}$ $5\cdot10^{-5}$	-6,32	Ч Ч	Р Р

Примітка: Ч – культура чутлива; Ч* – культура частково чутлива; Р – культура резистентна.

ню до «класичного» штаму (H37Rv), так і по відношенню до мультирезистентного штаму *M. tuberculosis* (HR). Зокрема, високу активність продемонструвала сполука **2**. У чинних концентраціях $5 \cdot 10^{-4}$ та $5 \cdot 10^{-5}$М сполука **2** інгібувала ріст не лише чутливого, а й мультирезистентного штаму мікобактеріальної культури. Сполуки **1**, **3** та **4** у концентрації $5 \cdot 10^{-4}$ М також пригнічували ріст штаму HR *M. tuberculosis.* При зниженні їх концентрації до $5 \cdot 10^{-5}$ М активність сполук частково зменшувалася. Всі досліджені сполуки пригнічували ріст мікобактеріальної культури штаму H37Rv.

Отримані результати біологічного дослідження антимікобактеріальної активності синтезованих похідних ізоніазиду підтвердили прогноз активності, отриманий за допомогою QSAR моделі (таблиця).

За результатами QSAR моделювання та біологічного тестування синтезованих похідних ізоніазиду визначено «сполуку-лідер» (**2**) – N^1-(3-нітрофенілметиліден)піридин-4-карбогідразид, що виявила активність проти мультирезистентного штаму (HR) *M. tuberculosis*.

Хоча гідразид ізонікотинової кислоти широко використовують для лікування туберкульозу, у 70% випадків до нього швидко формується резистентність [24]. Тому подальше використання запропонованої QSAR моделі антимікобактеріальної активності є актуальним та перспективним підходом для пошуку нових потенціальних протитуберкульозних засобів серед похідних ізоніазиду.

Висновки

Проведений QSAR аналіз дозволив з високою точністю відібрати 7 сполук серед похідних ізоніазиду з найвищим прогнозованим рівнем антимікобактеріальної активності для цілеспрямованого синтезу та біологічної оцінки. Всі синтезовані сполуки, як і передбачалось, виявили високу протитуберкульозну активність. Ідентифікована «сполука-лідер» – N1-(3-нітрофенілметиліден)-піридин-4-карбогідразид з високою активністю проти мультирезистентного штаму (HR) *M. tuberculosis* є оригінальним об'єктом для поглиблених досліджень як потенційний антимікобактеріальний агент.

Література

1. *Petrenko V. M. Ukrayns`kyj Pul`monologichnyj zhurnal – Ukrainian Pulmonology Journal, 2007, No.3, pp.35-39.*
2. *World Health Organization. Global Tuberculosis Control: WHO Report 2012, Geneva: World Health Organization, WHO/CDS/CPC/TB/99.259.*
3. *Panin I. V., Dobin V. L., Kochetkova G. V., Zamurueva E. V. Mezhdisciplinarnye aspectydifferencial`noj diagnostiki s lechenija bol`nyh tuberculezom, 2012, pp.54-55.*
4. *Cubillos-Ruiz A., Morales J., Zambrano M. M. Bio. Med. Central. Research Notes, 2008, doi:10.1186/1756-0500-1-110.*
5. *Levyc`ka N. A., Bajora Y. I.,Nikolaevs`kyj V. V., Asmolov O. K. Ukrayns`kyj Pul`monologichnyj zhurnal – Ukrainian Pulmonology Journal, 2003, No.4, pp.17-19.*
6. *Ostroverha Y. A, Berenazhna L. V., Koval` J. B., Lozyns`ka H. R., Romanec` O. M. Profilaktyka tuberkul`ozu. Metodychnyj posibnyk. L`viv, 2012, p.168.*
7. *Strachunskij L. S., Belousov Y. B., Kozlov C. N. Prakticheskoe rukovodstvo po nfekcionnoj himioterapii. Smolensk, 2002, p.586.*
8. *Kovalishyn V., Kopernyk I., Chumachenko S., Shablykin O., Kondratyuk K., Pil'o S., Prokopenko V., Brovarets V., Metelytsia L. Computational Biology and Bioinformatics, 2014, Vol. 2, No.2, pp.25-32.*
9. *Kovalishyn V., De Sousa J. A., Ventura C., Leitao R. E., Martins F. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2011, Vol. 107, pp.69-74.*
10. *https://www.chemaxon.com/, (accessed in January, 2014).*
11. *http://www.talete.mi.it/products/dragon_description.htm (accessed in March 2014).*
12. *Tetko I. V. J. Chem. Inf. Comput. Sci. Vol., 2002, No.42, pp.717-728.*
13. *Kovalishyn V., Tanchuk V., Charochkina L., Semenuta I., Prokopenko V. Journal of Molecular Graphics and Modeling, 2012, Vol. 32, pp.32-38.*
14. *Tetko I. V., Villa A. E. P. Neural Networks, 1997, No.10, pp.1361-1374.*
15. *Cramer R. D., Patterson D. E., Bunce J. D. J. Am. Chem. Soc., 1988, Vol. 110, No.18, pp.5959-5967.*
16. *Tropsha A. Mol. Inf., 2010, No.29, pp.476-488.*
17. *Tetko I. V., Villa A. E. P., Aksenova T. I. et al. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1998, Vol. 38, pp.676-684.*
18. *Kovalishyn V. V., Tetko I. V., Luik A. I., Kholodovych V. V., Villa A. E. P., Livingstone D. J. J. Chem. Inf. Comp. Sci., 1998, No.38, pp.651-659.*
19. *Lo Monte F., Kramer T., Gu J., Brodrecht M., Pilakowski J., Fuertes A., Dominguez J.M., Plotkin B., Eldar-Finkelman H., Schmidt B. European Journal of Medicinal Chemistry, 2013, Vol. 61, pp.26-40.*
20. *Rao V. S., Chandra Sekhar K. V. G. Synthetic Communications, 2004, Vol. 34, No.12, pp.2153-2157.*
21. *Martins F., Santos S., Ventura C., Elvas-Leitao R., Santos L., Vitorino S., ReisM., Miranda V., Correia H., Aires-De-Sousa J., Kovalishyn V., Latino D., Ramos J., Viveiros M. European Journal of Medicinal Chemistry, 2014, Vol. 81, pp.119-138.*
22. *Sah, Peoples. Journal of the American Pharmaceutical Association, 1954, Vol. 43, pp.513-514.*
23. *Todoriko L. D., Eremenchuk I. V., Chornous V. O., Grozav A. M. Pul`monologichnyj zhurnal – Ukrainian Pulmonology Journal, 2012, No.1, pp.8-12.*
24. *Rafiq Y., Jabeen K., Hasan R. PLOS ONE Journal Information, 2012, doi:10.1371/journal.pone.0050551, http://www.plosone.org/*

Надійшла до редакції 26.12.2014 р.

UDC 547.792.03/.04.057

SYNTHESIS AND THE STUDY OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF 2-((5-(PHENOXYMETHYL)-4-R-1,2,4-TRIAZOLE-3-YL)THIO)ETHAN-1-OLS AND THEIR DERIVATIVES

Yu.M.Kucheryavyi, A.G.Kaplaushenko, T.V.Panasenko, A.S.Korzhova, F.Al Zedan

Zaporozhye State Medical University
Zaporozhye, 26 Mayakovsky Av. E-mail: zsmu@zsmu.zp.ua

Key words: 1,2,4-triazole; synthesis; physical and chemical properties; high performance liquid chromatography-mass spectrometry

The number of new various diseases increases with the development of science and technology. But currently medicine does not have effective ways to overcome this problem. There is a large number of different pharmacological groups of drugs at the pharmaceutical market, but some of them are not available for the Ukrainian consumers. Therefore, the main task of national scientists in the field of pharmaceutical synthesis is the search for new biologically active substances and their further introduction into medical practice as new, low-toxic, original medicines of the Ukrainian production at an affordable price. The aim of our research is the synthesis of a new class of biologically active substances, namely 2-((5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethan-1-ols and their derivatives. All compounds obtained have been synthesized from 5-(phen-oxymethyl)-4-R-1,2,4-triazol-3-thiones (R = H, C_2H_5, C_6H_5) using electrophilic and nucleophilic substitution reactions when heating. The structure of the compounds synthesized has been confirmed by using a modern set of physical and chemical methods such as IR-spectrometry, ^{1}H NMR spectrometry and elemental analysis, and their individuality by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. The work in determining the parameters of acute toxicity and biological activity is continued.

СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ 2-((5-(ФЕНОКСИМЕТИЛ)-4-R-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)ТІО)ЕТАН-1-ОЛІВ І ЇХ ПОХІДНИХ
Ю.М.Кучерявий, А.Г.Каплаушенко, А.С.Коржова, Ф.Ал Зедан
Ключові слова: *1,2,4-триазол; синтез; фізико-хімічні властивості; ультрависокоефективна рідинна хромато-мас-спектрометрія*
З розвитком науково-технічного прогресу зростає кількість нових різноманітних захворювань, на подолання яких у медицині не існує на сьогодні ефективних методів лікування. На світовому фармацевтичному ринку існує численна кількість різних фармакотерапевтичних груп лікарських засобів, але не всі вони доступні українському споживачу. Тому основним завданням вітчизняних науковців у галузі фармацевтичного синтезу є пошук нових біологічно активних речовин та подальше їх впровадження у лікарську практику в якості нових, малотоксичних, оригінальних лікарських препаратів українського виробництва за доступною ціною. Метою нашого дослідження є синтез нового класу біологічно активних речовин – 2-((5-(феноксиметил)-4-R-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етан-1-олів та їх похідних. Всі отримані сполуки були синтезовані на основі 5-(феноксиметил)-4-R-1,2,4-триазол-3-тіонів (R = H, C_2H_5, C_6H_5) з використанням реакцій електрофільного та нуклеофільного заміщення при нагріванні. Будова синтезованих сполук підтверджена комплексним використанням сучасних фізико-хімічних методів: ІЧ-спектрофотометрії, ^{1}H ЯМР-спектрометрії та елементного аналізу, а їх індивідуальність – ультрависокоефективною рідинною хромато-мас-спектрометрією. Продовжується робота зі встановлення показників гострої токсичності та біологічної активності.

СИНТЕЗ, ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ 2-((5-(ФЕНОКСИМЕТИЛ)-4-R-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ИЛ)ТИО)ЭТАН-1-ОЛОВ, А ТАКЖЕ ИХ ПРОИЗВОДНЫХ
Ю.Н.Кучерявый, А.Г.Каплаушенко, А.С.Коржова, Ф. Ал Зедан
Ключевые слова: *1,2,4-триазол; синтез; физико-химические свойства; ультравысокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия*
С развитием научно-технического прогресса увеличивается количество новых разнообразных заболеваний, на преодоление которых медицина сегодня не имеет эффективных методов лечения. На мировом фармацевтическом рынке существует многочисленное количество различных фармакотерапевтических групп лекарственных средств, но не все они доступны украинскому потребителю. Поэтому основной задачей отечественных ученых в области фармацевтического синтеза является поиск новых биологически активных веществ и дальнейшее их внедрение во врачебную практику в качестве новых, малотоксичных, оригинальных лекарственных препаратов украинского производства по доступной цене. Целью нашего исследования является синтез нового класса биологически активных веществ – 2-((5-(феноксиметил)-4-R-1,2,4-триазол-3-ил)тио)этан-1-олов и их производных. Все полученные соединения были синтезированы на основе 5-(феноксиметил)-4-R-1,2,4-триазол-3-тионов (R=H, C_2H_5, C_6H_5) с использованием реакций электрофильного и нуклеофильного замещения при нагревании. Строение синтезированных соединений подтверждено комплексным использованием современных физико-химических методов: ИК-спектрофотометрии, ^{1}H ЯМР-спектрометрии, элементного анализа, а их индивидуальность – ультравысокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Продолжается работа по установлению показателей острой токсичности и биологической активности.

The search of biologically active substances is an important part of the pharmaceutical science development. Over the past decades 1,2,4-triazole derivatives have proven themselves as highly effective drugs, which are used in various fields, including medicine. Despite the wide application 1,2,4-triazoles-3-thione derivatives are insufficiently studied. Therefore, the study of synthetic, physical and chemical properties of 5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazol-3-thiones derivatives is a topical problem for scientists today and has practical importance, especially for further prediction and determination of the pharmacological activity.

The aim of our research is the synthesis of a new biologically active substances – 2-((5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethan-1-ols (R = H, C_2H_5, C_6H_5) and their derivatives.

In our work 5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-thiones (**1-3**) obtained by the methods known in the literature were used as initial substances [1, 3, 4, 7]. The corresponding 2-((5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-yl)thio)ethan-1-ols (**4-6**, Scheme) were obtained from the reaction between the initial thiones and 2-chloroethanol in the sodium methoxide medium. Substitution of the alcoholic hydroxyl in compounds **4-6** to the atom of chlorine was performed in the medium of thionyl chloride with further distillation of the solvent. The compounds **7-9** obtained reacted with sodium salts of 5-R_1-4-R_2-1,2,4-triazole-3-thiones (I-IX, Scheme) [4, 5, 6] in the DMF medium when heating.

The structure of the compounds synthesized has been confirmed by using a modern set of physical and chemical methods such as IR-spectrometry, ^{1}H NMR spectrometry and elemental analysis, and their individuality by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC MS).

During our synthetic work 16 new compounds of 2-((5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-yl)thio) ethan-1-ols and their derivatives were obtained. The physical and chemical constants are shown in Table 1 and comply with data of the specialized literature.

The study of some physical and chemical properties of the compounds synthesized was performed by the methods described in the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU, ed.1). The melting point was determined by the capillary method (2.2.14) on PTP (M) apparatus [2].

The elemental composition of new compounds was determined in an ELEMENTAR vario EL cube elemental analyzer (sulfonamide as a standard).

IR spectra were recorded in potassium bromide tablets (the concentration of the substance is 1%) with a Specord M-80 spectrophotometer in the region of 4000-500 cm^{-1} (the scanning conditions: the programme 3.0, the time constant – τ = 3 s, the scan time 33 min).

NMR spectra were recorded on a "Varian VXR-300" nuclear magnetic resonance spectrophotometer, the solvent was DMSO-D6, the internal standard was tetramethylsilane. The data were decoded with an ADVASP 143 computer programme [8].

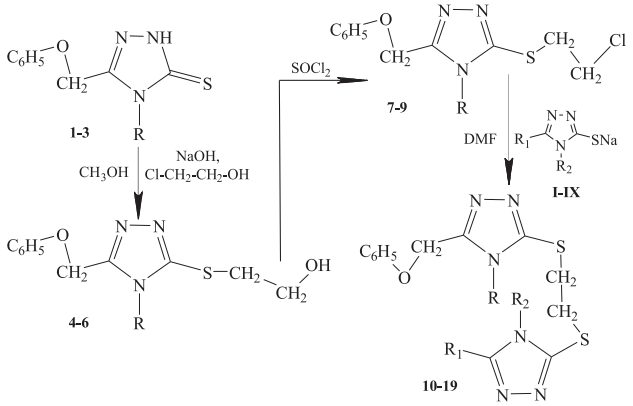
The compounds synthesized were studied using LC MS device: an Agilent 1260 Infinity HPLC System (degasser, binary pump, autosampler, column thermostat, diode array detector); an Agilent 6120 single-quadrupole mass spectrometer with electrospray ion source (ESI); OpenLAB Software CDS. The chromatographic conditions: 1) binary gradient – A: H_2O (HCOOH 0.1%), B: CH_3CN (HCOOH 0.1%); 2) column – Zorbax SB-C18, 30×4.6 mm, 1.8 μm; 3) column temperature – 40°C; 4) DAD – 210, 254 nm; 5) ion Source – API-ES; 6) scan mass range – 160-1000; 7) fragmentor – 10V; 8) positive polarity; 9) temperature of nitrogen – 300°C; 10) nebulizer pressure – 40 psig; 11) gas dryer velocity (nitrogen) – 10 l/min.

In the IR spectra of the compounds synthesized the adsorption bands of C=N groups are present in the range of 1634-1486 cm^{-1}, the adsorption bands of the aromatic ring are in 1602-1470 cm^{-1}, the intense bands of C=S-groups are in 705-570 cm^{-1}. In the IR spectra of compound **11** (Tab. 2) fluctuations of the NH_2 group at 3457 cm^{-1}, symmetric fluctuations of the NO_2 group at 1350 cm^{-1} and asymmetric fluctuations at 1510 cm^{-1} have been found.

The presence of alcohol radicals in compounds **4-6** is confirmed by valence fluctuations at 3610-3593 cm^{-1} and deformation fluctuations at 1424-1390 cm^{-1}, 720-680 cm^{-1}. The IR spectra of compounds **7-9** (Tab. 2) have adsorption bands at 645-652 cm^{-1} and 705-715 cm^{-1}, which may indicate the presence of chlorine [8].

NMR spectra are characterized by the presence of 5 proton signals (multiplet) of the phenyl substituent at 5.60-8.29 ppm, the protons signals of OH-groups (**4-6**, Tab. 3) at 5.03-5.08 ppm and of the amino group of compound **11** at 5.79 ppm [8]. In NMR spectra of compounds **4**, **6-19** the proton signals of methylene groups at 2.69-5.37 ppm and methyl radicals at 1.13-3.94 ppm (**5**, **8**, **10**, **12**, **14-18**, Tab. 3) have been found.

There are peaks of pseudomolecular ions (MH^+) in the mass spectra of the main components. It confirms obtaining of the target products with the appropriate molecular weights. The work in determi-



R = H, C_2H_5, C_6H_5; R_1 = C_6H_5-O-CH_2, CH-(C_6H_5)OH, $C_6H_4OCH_3$-2, $C_6H_4OCH_3$-3, $C_6H_4OCH_3$-4, $C_6H_2(OCH_3)_3$-3,4,5, $C_6H_4NO_2$-4, py; R_2 = H, C_2H_5, C_6H_5, NH_2, $C_6H_4OCH_3$-2.

Scheme. Synthesis of 2-((5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-yl) thio)ethan-1-ols and their derivatives.

Table 1

Physical and chemical constants of 2-((5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-yl)thio)ethan-1-ols and their derivatives

No. of compunds	R	R_1	R_2	T_m, °C	Gross formula	Yield, %	Found, %			Calculated, %			M	$M \cdot H^+$
							C	N	S	C	N	S		
4	H	-	-	107-108	$C_{11}H_{13}N_3O_2S$	81	52.41	16.51	12.89	52.57	16.72	12.76	251.3	252
5	C_2H_5	-	-	128-130	$C_{13}H_{17}N_3O_2S$	87	55.71	15.29	11.12	55.89	15.04	11.48	279.4	280
6	C_6H_5	-	-	110-112	$C_{17}H_{17}N_3O_2S$	89	62.08	12.9	9.71	62.36	5.23	9.79	327.4	328
7	H	-	-	98-99	$C_{15}H_{13}N_3OS$	77	48.72	15.35	12.29	48.98	15.58	11.98	269.8	270
8	C_2H_5	-	-	118-120	$C_{13}H_{16}ClN_3OS$	81	52.31	13.82	10.43	52.43	14.11	10.77	297.8	298
9	C_6H_5	-	-	95-97	$C_{17}H_{16}ClN_3OS$	76	59.2	12.31	9.35	59.04	12.15	9.27	345.9	346
10	C_6H_5	$C_6H_2(OCH_3)_3$-3,4,5	H	146-148	$C_{28}H_{28}N_6O_4S_2$	80	58.02	14.32	10.98	58.32	14.57	11.12	576.7	577
11	C_6H_5	$C_6H_4NO_2$-4	NH_2	124-126	$C_{25}H_{22}N_8O_3S_2$	79	54.71	20.42	11.52	54.93	20.50	11.73	546.2	547
12	C_6H_5	$C_6H_4OCH_3$-2	H	128-130	$C_{26}H_{24}N_6O_2S_2$	86	60.10	16.01	12.63	60.44	16.27	12.41	516.6	517
13	C_6H_5	$C_6H_4OCH_3$-3	H	124-126	$C_{26}H_{24}N_6O_2S_2$	79	60.13	16.08	12.49	60.44	16.27	12.41	516.6	517
14	C_6H_5	$C_6H_4OCH_3$-4	H	170-172	$C_{26}H_{24}N_6O_2S_2$	83	60.52	16.38	12.59	60.44	16.27	12.41	516.6	517
15	C_6H_5	Py	$C_6H_4OCH_3$-2	122-124	$C_{31}H_{27}N_7O_2S_2$	89	62.41	16.31	10.54	62.71	16.51	10.80	593.7	594
16	C_2H_5	Py	$C_6H_4OCH_3$-2	86-88	$C_{27}H_{27}N_7O_2S_2$	81	59.58	17.53	11.59	59.43	17.97	11.75	545.7	546
17	C_2H_5	C_6H_5-O-CH_2	C_2H_5	92-94	$C_{24}H_{28}N_6O_2S_2$	90	57.81	17.21	12.83	58.04	16.92	12.91	496.7	497
18	C_2H_5	C_6H_5-O-CH_2	C_6H_5	134-135	$C_{28}H_{28}N_6O_2S_2$	89	62.08	15.52	11.49	61.74	15.43	11.77	544.69	545
19	H	C_6H_5-O-CH_2	C_6H_5	130-132	$C_{26}H_{24}N_6O_2S_2$	75	60.32	16.04	12.63	60.45	16.27	12.41	516.6	517

Table 2

IR absorptions of 2-((5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-yl)thio)ethan-1-ols and their derivatives

No. of compunds	Absorption frequency, cm^{-1}								
	$\nu_{(C=N \text{ in cycle})}$	$\nu_{(OH)}/\delta_{(OH)}$	$\nu_{(Ar)}$	$\nu_{(C-S)}$	$\nu_{(C6H5O)}$	$\delta_{(CH_2)}/\nu_{s(CH_2)}, \nu_{as(CH_2)}$	$\nu_{s(CH_3OC_6H_4)}$	ν_{Cl}	$\nu_{(py)}/\delta_{(py)}$
4	1583	3594/1420, 680	1519	722	1371	1468/2865, 2938	-	-	-
5	1499	3593/1424, 720	1589	689	1369	1475/2852, 2946	-	-	-
6	1572	3610/1390, 708	1578	622	1356	1488/2846, 2933	-	-	-
7	1619	–	1589	646	1372	1477/2853, 2957	–	650, 705	–
8	1475	–	1620	635	1353	1484/2858, 2925	–	645, 715	–
9	1577	–	1489	708	1378	1479/2841, 2954	–	652, 709	–
10	1488	–	1535	701	1346	1471/2862, 2942	2850	–	–
11	1584	–	1544	658	1367	1476/2849, 2965	–	–	–
12	1489	–	1470	699	1349	1476/2846, 2931	2852	–	–
13	1543	–	1587	657	1359	1456/2856, 2948	2851	–	–
14	1494	–	1562	711	1328	1466/2848, 2954	2850	–	–
15	1562	–	1573	684	1336	1478/2856, 2949	2850	–	1200/710, 1100
16	1533	–	1581	693	1356	1458/2865, 2931	2850	–	1202/712, 1104
17	1567	–	1577	654	1387	1475/2846, 2943	–	–	–
18	1485	–	1605	630	1366	1481/2845, 2930	–	–	–
19	1634	–	1598	678	1363	1471/2855, 2939	–	–	–

Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2015. – Т. 13, вип. 1 (49) ISSN 2308-8303

Table 3

The protons signals of 2-((5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-yl)thio)ethan-1-ols and their derivatives

No. of compunds	δ, ppm, TMS
4.	3.69-5.14 (2H, m, CH_2), 5.08 (1H, c, OH), 6.97-7.29 (5H, m, C_6H_5), 12.59 (1H, c, NH)
5	1.32 (3H, m, CH_3), 3.70-5.35 (2H, m, CH_2), 5.06 (1H, c, OH), 6.95-7.37 (5H, m, C_6H_5)
6	3.71-5.32 (2H, m, CH_2), 5.03 (1H, c, OH), 6.97-7.65 (5H, m, C_6H_5)
7	3.23-5.19 (2H, m, CH_2), 6.91-7,33 (5H, m, C_6H_5), 12.94 (1H, c, NH)
8	1.13 (3H, m, CH_3), 2.69-4.95 (2H, m, CH_2), 5.08 (1H, c, OH), 6.94-7.32 (5H, m, C_6H_5), 9.33 (1H, c, NH)
9	2.75-4.95 (2H, m, CH_2), 6.4-7.34 (5H, m, C_6H_5), 9.15 (1H, c, NH)
10	3.72-3.84 (3H, m, CH_3), 3.81-5.36 (2H, m, CH_2), 6.96-7.61 (5H, m, C_6H_5), 12.94 (1H, c, NH)
11	3.82-5.37 (2H, m, CH_2), 5.79 (2H, c, NH_2), 6.94-8.29 (5H, m, C_6H_5)
12	3.77-5.36 (2H, m, CH_2), 3.84 (3H, m, CH_3), 6.95-7.98 (5H, m, C_6H_5), 12.95 (1H, c, NH)
13	3.75-5.33 (2H, m, CH_2), 6.92-7.99 (5H, m, C_6H_5), 12.96 (1H, c, NH)
14	3.80-5.31 (2H, m, CH_2), 3.84 (3H, m, CH_3), 6.95-8.08 (5H, m, C_6H_5), 12.90 (1H, c, NH)
15	3.74-5.30 (2H, m, CH_2), 3.93 (3H, c, CH_3), 5.60-7.58 (5H, m, C_6H_5)
16	1.32-3.89 (3H, m, CH_3), 3.75-5.36 (2H, m, CH_2), 5.63-7.62 (5H, m, C_6H_5)
17	1.33-3.94 (3H, m, CH_3), 3.75-5.32 (2H, m, CH_2), 5.62-7.64 (5H, m, C_6H_5)
18	1.33 (3H, m, CH_3), 3.81-5.30 (2H, m, CH_2), 6.94-7.65 (5H, m, C_6H_5)
19	3.80-5.12 (2H, m, CH_2), 6.93-7.64 (5H, m, C_6H_5), 11.15 (1H, c, NH)

ning the parameters of acute toxicity and biological activity is in progress.

Experimental Part

2-((5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-yl)thio) ethan-1-ols (4-6).

General procedure: To the mixture of 5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-thiones (0.01 mol) in methanol (30 ml) and the aqueous solution of NaOH (0.01 mol) add 2-chloroethanol (0.01 mol). Boil the reaction mixture for 2 h and then cool. Filter the precipitate and distill the solvent of the filtrate. Purify the compounds obtained **4-6** with 15 ml of diethyl ether. They are white crystalline substances, which are insoluble in water and soluble in organic solvents.

5-(phenoxymethyl)-4-R-3-(2-chloroethylthio)-1,2,4-triazoles (7-9).

General procedure: Boil the reaction mixture of 2-((5-(Phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-yl)thio) ethan-1-ols (0.01 mol) and thionyl chloride (40 ml) for 2 h with further distillation of $SOCl_2$ excess. The compounds obtained are brown amorphous hygroscopic substances, which are insoluble in water and soluble in organic solvents.

5-(2-(5-phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-ylthio) ethylthio)-3-R_1-1,2,4-triazoles (10-19).

General procedure: To the mixture of 5-(phenoxymethyl)-4-R-3-(2-chloroethylthio)-1,2,4-triazoles (0.01 mol) in DMF (30 ml) add sodium salts of 5-R_1-4-R_2-1,2,4-triazole-3-thiones (0.01 mol). Boil the reaction mixture for 2 h and then cool. Filter the precipitate and evaporate the solvent. Purify the compounds synthesized by recrystallization in the mixture of DMF: water (1:2). Compounds are light yellow (**15-16**) or light brown (**10-14, 17-19**) crystalline substances, which are insoluble in water and soluble in organic solvents.

Conclusions

1. The effective synthetic methods of 2-((5-(phenoxymethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-yl)thio)ethan-1-ols and their derivatives have been developed.

2. The structure of the compounds obtained has been confirmed with a set of modern physical and chemical methods of analysis, and their individuality has been proven by HPLC MS.

3. The study of acute toxicity and biological activities of the compounds obtained is continued.

References

1. *Каплаушенко А. Г. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості S-похідних 5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-1,2,4-триазол-3-тіонів: Дис. ... кандидата фармац. наук. 3., 2005, 98 с.*
2. *Катрицкий А. Р. Физические методы в химии гетероциклических соединений. М.: Мир, 1966, С. 327-329.*
3. *Кныш Е. Г. Синтез, физико-химические и биологические свойства N- и S-замещенных 1,2,4-триазола: Дис. ... докт. фармац. наук. Х., 1987, 350 с.*
4. *Синтез та фізико-хімічні властивості 5-R-4-R1-1H-1,2,4-триазол-3-тіонів. Фармаком, 2014, №1, С. 82-86.*
5. *Щербак М. О., Каплаушенко А. Г. Синтез, фізико-хімічні властивості та подальші перетворення 5-(3-, 4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіонів та їх іліденамінопохідних. Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики, 2013, №2 (12), С. 129-132.*
6. *Самелюк Ю. Г., Каплаушенко А. Г., Пругло Є. С. Синтез та актопротекторна активність солей 2-(5-(4-метоксифеніл (3,4,5-триметоксифеніл))-1,2,4-триазол-3-ілтіо)-ацетатних кислот. Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики, 2014, №2 (83), С. 107-111.*
7. *Каплаушенко А. Г. Синтез, будова і біологічна активність похідних 4-моно- та 4,5-дизаміщених 1,2,4-триазол-3-тіону: Дис. ... докт. фармац. наук. 3., 2008, 66 с.*
8. *Казицина Л. А., Куплетская Н. Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М.: Высш. шк., 1971, 264 с.*

Надійшла до редакції 30.01.2015 р.

УДК 547.639 + 615.281

АНТИМІКРОБНА ТА ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ КАЛІКСАРЕНІВ

Р.В.Родік

Інститут органічної хімії НАН України
02660, м. Київ, вул. Мурманська, 5. E-mail: manli@ioch.kiev.ua

Ключові слова: каліксарени; бактерицидна активність; противірусна активність; фунгіцидна дія; протитуберкульозна активність

Каліксарени – це перспективний клас макроциклічних сполук, який широко використовується у дизайні біологічно активних речовин. Серед каліксаренів є сполуки з антитромботичною та протипухлинною дією, блокатори аніонних каналів та модулятори катіонних помп, селективні інгібітори ферментів та сполуки, що моделюють їх дію. В останні роки інтенсивно досліджується антимікробна та противірусна активність каліксаренів. В даному огляді систематизовані дані по бактерицидній, фунгіцидній, протитуберкульозній та противірусній активності модифікованих каліксаренів. Наведені дані про механізми дії різних типів каліксаренів на біооб'єкти. Встановлено, що основою антимікробної дії більшості каліксаренів є взаємодія з компонентами зовнішньої мембрани або клітинної стінки. Функціоналізація каліксаренової платформи фармакофорними групами, які чинять антимікробну дію, не завжди призводить до збільшення очікуваної активності. Найбільшу антибактеріальну дію мають полікатіонні каліксарени, в той час як поліаніонні макроцикли інгібують активність вірусів. Каліксарени, модифіковані циклопептидними фрагментами, є селективними блокаторами важливих глікопротеїнів клітин бактерій. Вони є міметиками ванкоміцину за механізмом дії та рівнем бактерицидної активності. Неіонний водорозчинний каліксарен з поліетиленглікольними групами має унікальний механізм протитуберкульозної дії. Він пригнічує ріст M. tuberculosis всередині клітин-макрофагів людини. Наведені хіміотерапевтичні індекси досліджуваних сполук становлять більше десяти одиниць, що свідчить про їх низьку цитотоксичність.

THE ANTIMICROBIAL AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF CALIXARENES

R.V.Rodik

Key words: *calixarene; bactericidal activity; antiviral activity; fungicidal activity; antituberculosis activity*

Calixarenes is a promising class of macrocyclic compounds, which are widely used in the design of biologically active substances. Among calixarenes there are anion channel blockers and modulators of cationic pumps, selective enzyme inhibitors and compounds simulating their action, substances with the antithrombotic and antitumour effect. The antimicrobial and antiviral activities of modified calixarenes have been intensively studied in recent years. The results on bactericidal, fungicidal, antituberculosis, as well as antiviral activity of calixarenes have been systematized and analyzed in this review. The data about the mechanisms of action of different types of calixarenes on biological objects are presented. It has been found that the basis of the antimicrobial action of many calixarenes is the interaction with the components of the outer membrane or cell wall. Moreover, functionalization of the calixarene platform with pharmacophoric groups possessing the antimicrobial activity does not always lead to increase in the expected activity. Polycationic calixarenes show the highest antibacterial action, while polyanionic macrocycles inhibit the activity of viruses. Calixarenes modified with cyclopeptide fragments are selective binders and blockers of important bacterial cell glycoproteins. They are mimetics of vancomycin by their mechanism of action and the level of the bactericidal activity. The water soluble calixarene with polyethylene glycol groups has a unique mechanism of the antituberculosis action. It inhibits the growth of M. tuberculosis inside human macrophage cells. The chemotherapeutic indexes of the compounds studied are more than ten units, indicating their low cytotoxicity.

ПРОТИВОМИКРОБНАЯ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ КАЛИКСАРЕНОВ

Р.В.Родик

Ключевые слова: *каликсарены; бактерицидная активность; противовирусная активность; фунгицидное действие; противотуберкулёзная активность*

Каликсарены – это перспективный класс макроциклических соединений, который широко используется в дизайне биологически активных веществ. Среди каликсаренов есть соединения с антитромботическим и противоопухолевым действием, блокаторы анионных каналов и модуляторы катионных насосов, селективные ингибиторы ферментов и соединения, моделирующие их действие. В последние годы интенсивно исследуется их противомикробная и противовирусная активность. В данном обзоре систематизированы данные по бактерицидной, фунгицидной, противотуберкулезной и противовирусной активности модифицированных каликсаренов. Приведены данные о механизмах действия различных типов каликсаренов на биообъекты. Установлено, что в основе противомикробного действия большинства каликсаренов лежит взаимодействие с компонентами внешней мембраны или клеточной стенки. Вместе с тем, функционализация каликсареновой платформы фармакофорными группами, обладающими противомикробным действием, не всегда приводит к увеличению ожидаемой активности. Наибольшее антибактериальное действие имеют поликатионные каликсарены, в то время как полианионные макроциклы ингибируют активность вирусов. Каликсарены, модифицированные циклопептидными фрагментами, являются селективными блокаторами важных гликопротеинов клеток бактерий. Они являются миметиками ванкомицина по механизму и уровню бактерицидной активности. Водорастворимый каликсарен с полиэтиленгликольными группами имеет уникальный механизм противотуберкулёзного действия. Он подавляет рост M. tuberculosis внутри клеток-макрофагов человека. Приведены химиотерапевтические индексы исследуемых соединений, которые составляют более десяти единиц, что свидетельствует об их низкой цитотоксичности.

Пошук нових антимікробних препаратів, очевидно, ніколи не втратить актуальності. Через швидкий розвиток механізмів стійкості та їх передачу між мікроорганізмами цілі групи антимікробних препаратів втрачають ефективність одна за одною, тому проблема інфекційних захворювань, що не піддаються терапії, може постати з такою ж гостротою, як і в період до відкриття антибіотиків [1].

Можливим вирішенням питання постійного пристосування мікроорганізмів і особливо бактерій могло б бути введення у практику все нових і нових антибіотиків. Однак в наш час спостерігається зниження кількості ліцензування нових препаратів у цій галузі: так, за останні десятиріччя у клінічну практику введено лише два нових класи антибіотиків (оксазолідинони та ліпопептиди) [2]. Тому все активніше ведеться пошук препаратів, які б відповідали антибіотикам за ефективністю дії, проте не викликали стійкості у мікроорганізмів. До таких препаратів та засобів відносять бактеріофаги, ферменти, що викликають лізис, антимікробні пептиди вищих організмів, а також природні сполуки з антимікробною дією та їх синтетичні аналоги [3, 4]. Однак головною проблемою пошуку нових речовин природного походження часто є нерівноцінне співвідношення затраченого на скринінг часу та отриманих результатів.

Іншим сучасним методом створення біологічно активних сполук є молекулярний дизайн на основі структури мішені [4, 5]. Такої мішенню в широкому сенсі може бути позаклітинний, мембранозв'язаний або внутрішньоклітинний білок чи пептид, рідше небілкові молекули (вуглеводи, ліпіди, нуклеїнові кислоти) або їх супрамолекулярні комплекси. Якщо розглядати саме антимікробну активність, то такими мішенями зазвичай є компоненти зовнішньої мембрани або клітинної стінки бактерій, простіших або грибів та капсид або ліпідна оболонка вірусів. Найбільш поширений механізм дії антибіотиків природного походження спрямований на порушення синтезу клітинної стінки або порушення цілісності цитоплазматичної мембрани, що веде до порушення мембранного потенціалу клітин мікроорганізму. Тому при створенні нових високоефективних бактерицидних, фунгіцидних та противірусних сполук було б доцільним моделювання природних механізмів з використанням у якості мішені бактеріальної стінки, зовнішньої мембрани клітин або оболонки вірусів.

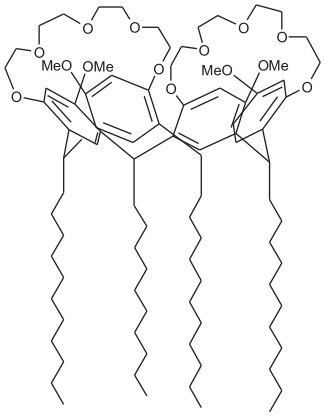
Потенційно ефективними антимікробними препаратами розглядаються макроцикли. Макроциклічним молекулам притаманна певна конформаційна організація, яку іноді порівнюють з доменною організацією біологічних макромолекул, яка дозволяє досягти достатнього рівня специфічності взаємодії з біомішенями [6]. Разом з тим, макроциклічні сполуки відзначаються гнучкістю та різноманіттям конформаційних переходів, що є надзвичайно важливим для біохімічних взаємодій. Однією з перспективних груп макроциклічних сполук, що використовуються у молекулярному дизайні антимікробних агентів, є калікс[n]арени. Калікс[n]арени – це макроциклічні сполуки, які отримують прецизійною циклоконденсацією *n*-заміщених фенолів та формальдегіду [7]. Завдяки наявності високоорганізованої ліпофільної порожнини, утвореної бензольними кільцями, модифіковані каліксарени здатні розпізнавати, зв'язувати у стійкі комплекси та розділяти близькі за властивостями катіони, аніони та нейтральні молекули [8, 9]. На теперішній час описано та запатентовано використання каліксаренів як сполук з бактерицидною, противірусною та фунгіцидною дією [10-12].

1. Бактерицидна активність

Бактерицидна дія солей срібла широко відома. Тому було синтезовано та досліджено металокомплекси каліксрезорцинарен-краун-етеру **1** з Ag(I). Такі комплекси у вигляді плівок, отриманих по технології Ленгмюр-Блоджет, інгібують ріст клітин *E. coli* при контактній дії [13]. У випадку застосування комплексів каліксаренів ріст склав лише 7% від контролю, в той час як окремо каліксарен або еквімолярний розчин нітрату срібла зменшував ріст до 72-85% відносно контролю (схема 1).

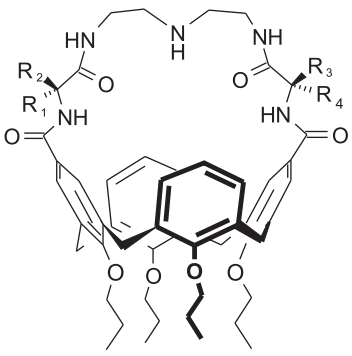
Каліксаренові міметики ванкоміцину **2а,б** в яких каліксаренова платформа функціоналізована пептидним містком, що містить D-, або L-аланільні залишки проявили значну антибактеріальну активність [14, 15] (схема 2).

Бактерицидна активність проти грампозитивних бактерій каліксаренів **2** коливається від середніх до високих значень, хоча менша за ванкоміцин (табл. 1). Каліксарени **2** подібно ванкомі-



1

Схема 1

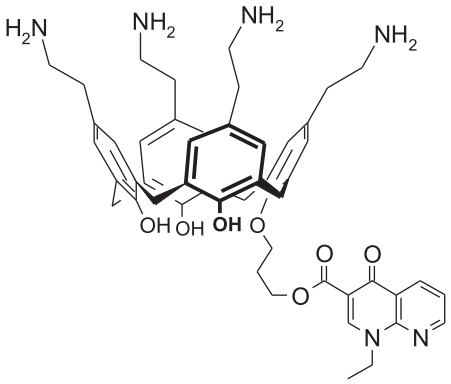


2a,b

a: $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = R_4 = CH_3$;

b: $R_2 = R_4 = H$, $R_1 = R_3 = CH_3$

Схема 2



3

Схема 3

Таблиця 1

In vitro активність пептидокаліксаренів **2а,б** та ванкоміцину проти деяких грампозитивних бактерій

Вид	Мінімальна інгібуюча концентрація, (МІК), мг/л		
	ванкоміцин	2а	2б
S. aureus 663	2	8	8
S. aureus 853	2	16	8
S. aureus 1131	2	4	4
S. epidermidis	2	4	8
B. cereus	2	16	НД

S. aureus 663 – пеніцилін-чутливий штам, *S. aureus 853* – пеніцилін-стійкий штам, *S. aureus 1131* – метицилін-стійкий штам, НД – не досліджувалось.

цину є неактивними по відношенню до грибів та дріжджів. Крім того, вони також не проявляють активності до бактерій, які не продукують клітинну стінку, наприклад, *Acholeplasma laidlawii.* Це свідчить про те, що молекулярна мішень **2** бере участь у формуванні клітинної стінки. Каліксарени **2** як і ванкоміцин не є клітинними токсинами, їх активність направлена тільки проти певних бактеріальних протеїнів.

Дослідження з використанням дифузних вимірювань ЯМР свідчить про те, що антибіотична активність **2** є наслідком зв'язування цими каліксаренами діаланільного залишку протеїну-прекурсору клітинної стінки бактерій. Розраховане з ЯМР експериментів значення log K_a у розчині $CDCl_3$, що містив 3% DMSO-d6 для комплексу **2б** з N-ацетил-L-ала-L-аланіном, складає 3,4 [16, 17]. Природа цих взаємодій є складною, оскільки дані каліксарени містять багато функціональних груп різного типу. Вірогідно мають місце електростатичні, CH-π, гідрофобні та диполь-дипольні взаємодії і утворення міжмолекулярних водневих зв'язків.

Таблиця 2

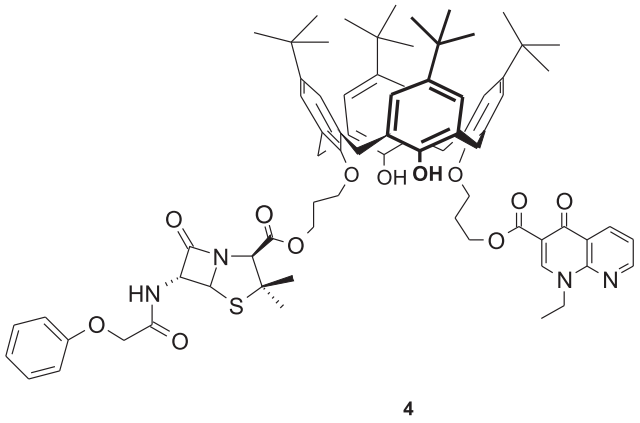
Значення МІК для каліксарену **3** та сполуки порівняння – налідиксової кислоти

Сполука	Каліксарен **3**		Налідиксова кислота	
	мМоль/л	мг/л	мМоль/л	мг/л
E. coli ATCC 25922	25	35	100	23
S. aureus ATCC 25923	50	70	200	46
S. aureus ATCC 29213	50	70	200	46
E. faecalis ATCC 29212	100	140	200	46
P. aeruginosa ATCC 27853	100	140	200	46

Каліксарени, модифіковані відомими фармакофорними групами з бактерицидною активністю, також виявляють антибактеріальну дію. Прикладом є водорозчинний кон'югат каліксарену з налідиксовою кислотою **3** [18], яка є відомим антимікробним агентом хінолонового ряду. В даному випадку бактерицидну активність таких каліксаренів автори пов'язують не з кооперативною дією фармакофорної групи та макроциклічного кістяку, а з доставкою активної сполуки в клітини до місця дії. Каліксарен виступає як переносчик, ферменти бактерії гідролізують естерний зв'язок та вивільняють фармакофорні налідиксові залишки.

Даний каліксарен проявив помірну антибактеріальну активність, результати наведені у табл. 2 (схема 3).

Як видно з даних табл. 2, у ваговому вираженні каліксарен має меншу активність, ніж налідиксова кислота. Але аналіз діючих молярних концентрацій вказує на 2-4-и кратну перевагу каліксарену **3**. Автори припускають, що його дія як переносчика цим не обмежується, і крім того існує кооперативний ефект амінокаліксарену (продукту гідролізу **3**) та налідиксової кислоти. Автори також синтезували ряд каліксаренів, модифікованих 2-ма хінолоновими або пеніцилінови-



4

Схема 4

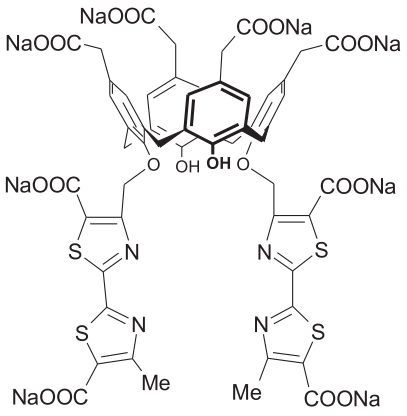
ми фрагментами [19-21], але бактерицидна активність даних сполук описана не була. Разом з тим, каліксарен **4**, модифікований одним хінолоновим та одним пеніциліновим фрагментом, показав деяку активність [22] (схема 4).

За даними авторів істотні бактерицидні властивості каліксарен **4** проявив тільки проти штаму золотистого стафілокока *S. aureus* ATCC 25923, але кількісні дані наведені не були.

Гексанатрієва сіль каліксарен-тетраоцтової кислоти **5** з бістіазолільними групами також проявила невисоку активність проти одного зі штамів золотистого стафілокока (S. aureus ATCC 25923) з МІК (128 мг/л). На інші тест-культури (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 та *P. aeruginosa* ATCC 27853) вона не впливала [23] (схема 5).

Слід відзначити, що вихідні каліксарен-тетраоцтові кислоти проявляють значну антивірусну активність.

Відомо, що такі антибактеріальні препарати як декаметоксин, етоній є двозарядними катіонними сполуками, які ефективно взаємодіють з мембранами бактерій та порушують їх функціонування, що викликає загибель клітин. Цілком логічно, що каліксарени модифіковані позитивно зарядженими групами і інтенсивно досліджувались в якості бактерицидних сполук. Одним з



5

Схема 5

перших було досліджено водорозчинний тетрагуанідинокаліксарен, протонований трифтороцтовою кислотою **6** [24-27] (схема 6).

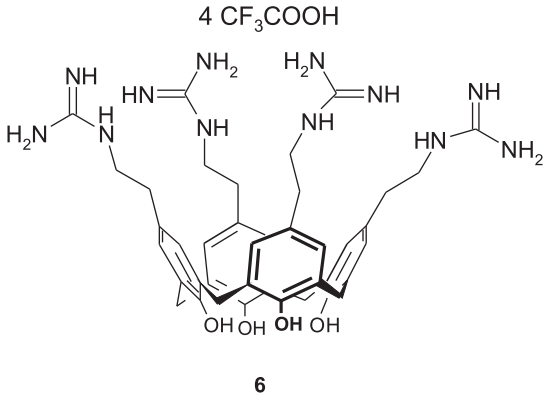
В даному випадку катіонний центр є плоским, тому що центральний атом вуглецю гуанідинового фрагменту має sp^2-гібридизацію, і така його будова сприяє утворенню водневих зв'язків з фосфатними залишками глікопротеїнів мембрани.

Бактерицидна активність каліксарену **6** порівнювалась з гексамідином, антисептиком з двома амідиновими групами, та бісгуанідином, синталіном А [28], значення мінімальних інгібуючих та бактеріостатичних концентрацій (МБК) яких наведені у табл. 3.

Як видно з табл. 3, гуанідинокаліксарен **6** та антисептик гексамідин мають близьку активність. Проте порівняння цитотоксичності цих сполук однозначно вказує на перевагу каліксарену. Якщо для гексамідину співвідношення IC_{50} (клітинні лінії HaCat та MRC5) до МІК на даних культурах є в межах від 1 до 37, тобто мінімальна інгібуюча концентрація для бактерій не набагато нижче за концентрацію, що викликає загибель 50% клітин, то для каліксарену **6** дане співвідношення є в межах 12-135, тобто він володіє значно меншою токсичністю [29].

Каліксарен **7**, модифікований чотирма морфоліновими групами, у водних розчинах є позитивно-зарядженим за рахунок автопротонування азоту достатньо кислими гідроксильними групами [30]. Його було досліджено на ряді штамів грампозитивних та грамнегативних бактерій та на грибах [31]. Бактерицидна активність **5** є значною: МІК в діапазоні 4-16 мг/л для грампозитивних тест-культур (роди *Staphylococcus, Streptococcus* та *Bacillus*) та 4-8 мг/л для грамнегативних бактерій (*Enterobacter, Escherichia, Klensiella, Salmonella*) (схема 7).

Автори [32] провели дослідження взаємозв'язків між будовою та бактерицидною дією ряду катіонних калікс[4]аренів. Тетрапропоксикаліксарени **8-10** проявили значну антибактеріальну активність (табл. 4), а їх тетраоктильні аналоги, які утворюють міцели у водних розчинах, виявились



6

Схема 6

Таблиця 3

МІК та МБК (мг/л) для тетрагуанідинокаліксарену **6** та сполук порівняння

Сполука	Каліксарен **6**		Гексамідин		Синталін А	
	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК
Музейні штами						
E. coli ATCC 25922	4	256	8	256	64	256
S. aureus ATCC 25923	8	256	4	128	64	>512
S. aureus ATCC 29213	8	256	<1	128	16	>512
E. faecalis ATCC 29212	32	>256	2	128	256	>512
P. aeruginosa ATCC 27853	32	256	32	>512	128	>512
Клінічні штами						
E. coli (продукує пеніциліназу)	2	256	8	64	64	>512
S. aureus (метицилін-стійкий)	8	256	2	64	64	64
E. faecium (інактивує ванкоміцин)	8	128	2	64	256	>512
E. faecalis (інактивує ванкоміцин)	64	256	4	256	>256	>512
P. aeruginosa (надвисока активність ефлюксних помп)	64	>256	64	>512	256	>512

Таблиця 4

Значення МІК для каліксаренів **8-10**, мг/л (мкМ)

Сполука	*S. aureus* ATCC 6538	*P. aeruginosa* ATCC 9027	*K. pneumoniae* ATCC 10031	*E. coli* ATCC 25922
8	≤10 (≤9)	50 (45)	≤10 (≤9)	≤10 (≤9)
9	≤10 (≤9)	1000 (870)	100 (90)	100 (90)
10	≤10 (≤5)	50 (26)	500 (260)	500 (260)

неактивними. Це узгоджується з даними по бактерицидній дії катіонних четвертинних амонійних солей, вона є слабкішою у міцелярних сполук, ніж у тих, що перебувають у вигляді молекулярного розчину при однакових концентраціях [33].

Найбільшу активність проявив каліксарен **8**, функціоналізований метилімідазолієвими групами. Це пояснюється тим, що ці групи мають плоску будову, яка полегшує їх кооперативну взаємодію з бактеріальною мембраною (схема 8).

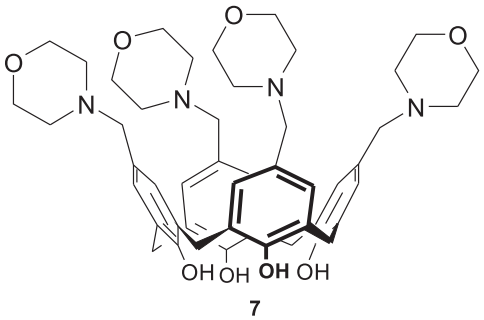
Також була перевірена здатність каліксаренів **8-10** інгібувати ріст бактеріальних біоплівок. Відомо, що колонії бактерій у формі плівок є значно стійкішими до дії антибіотиків та антисептиків. Виявилось, що каліксарен **10** здатен інгібувати ріст біоплівок при концентраціях вище 50 мг/л [32].

Загальний механізм дії катіонних каліксаренів на грамнегативні бактерії було досліджено на каліксаренах **11** та **12** [34] (схема 9).

Методами ЯМР- та УФ-титрування було встановлено, що вони взаємодіють з ліпополісахаридами зовнішнього шару плазмалеми грамнегативних бактерій. Така взаємодія пригнічує процес росту та поділу бактеріальної клітини, і таким чином проявляються бактеріостатичний та бактерицидний ефекти.

2. Протитуберкульозна активність

Відомо, що ліпофільні спирти та феноли функціоналізовані поліоксіетиленовими групами (ПЕГ-групами) впливають на розвиток туберкульозної інфекції всередині клітин організму, хоча не ді-



7

Схема 7

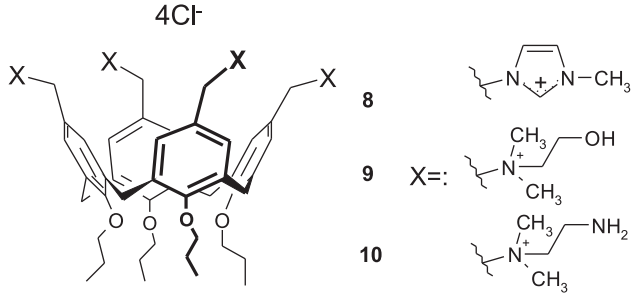


Схема 8

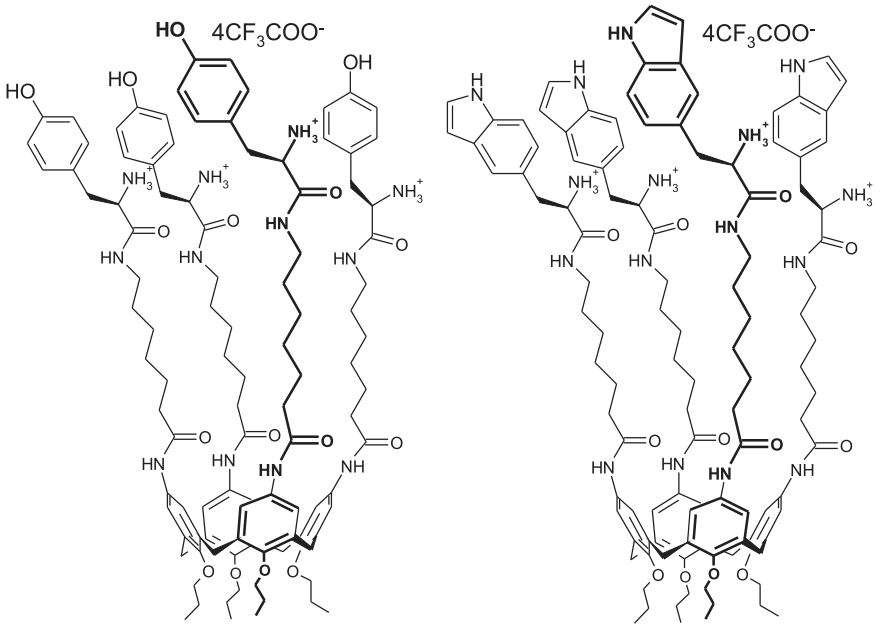


Схема 9

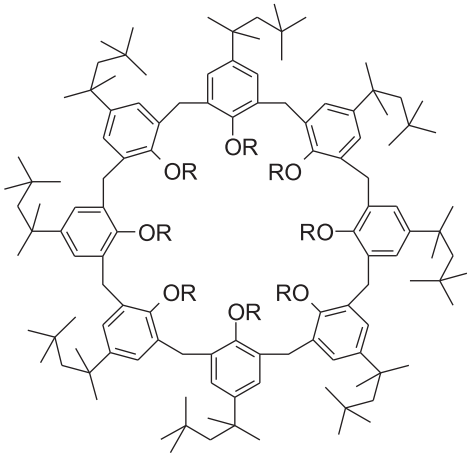
ють на саму мікобактерію. Авторами [35, 36] було здійснено синтез каліксаренів, модифікованих по нижньому вінцю макроциклу ПЕГ-групами різної довжини. Виявилось, що дані каліксарени проявляють сильний пролонгований ефект на перебіг туберкульозу, викликаного внутрішньоочеревинним введенням мишам мікобактерій виду *Mycobacterium tuberculosis* [37]. Так, каліксарен **13а** має антитуберкульозну дію, в той час як **13б** ускладнює перебіг туберкульозу [38] (схема 10).

Детальні дослідження були проведені на черевних макрофагах мишей жіночої статі (лінія альбіносів Паркса), які оброблялись розчином **13а** або **13б** з концентрацією 5 мг/мл, а потім мікобактеріями *M. tuberculosis*. Було показано, що ріст *M. tuberculosis* всередині макрофагів був пригнічений каліксареном **13а** і навпаки, стимульований каліксареном **13б**. Загальна ліпазна активність змінювалась аналогічно. Цей факт свідчить про те, що ліпіди та ліпідний обмін беруть участь у процесах, викликаних каліксаренами в експериментальних тварин, заражених *M. tuberculosis.* Тобто, має місце унікальний механізм, в якому клітини інфікованого хазяїна відіграють важливу роль і який є відмінним від дії всіх інших лікарських речовин, що застосовуються проти туберкульозу. Так як стійкість *M. tuberculosis* до звичайної терапії лікарськими засобами зростає, нові підходи до лікування туберкульозу є актуальними.

Катіонний водорозчинний гуанідинокаліксарен **6** та його похідні, модифіковані біс-гетероциклічними групами **14** та **15,** також є сильними протитуберкульозними агентами [39, 40]. Вони виявили здатність пригнічувати ріст двох штамів *M. tuberculosis*: $H_{37}Rv$ та стійкого до відомого протитуберкульозного агента ізоніазиду штаму MYC1565. Причому в останньому випадку ефективність каліксаренів **6, 14** та **15** вища, ніж у комерційних антибіотиків (табл. 5) (схема 11).

3. Протигрибкова активність

Протигрибкову активність проявляють сульфонатокалікс[n]арени **16-19** [41]. Їх досліджували проти таких видів грибів-патогенів культурних рослин: *Colletotrichum dematium* MAFF №840066, *Fusarium solani f. sp .mori* MAFF №840046 та *Rosellinia necatrix* MAFF №840051. В умовах досліду дані каліксарени пригнічували ріст патогенів на 60-70% (схема 12).



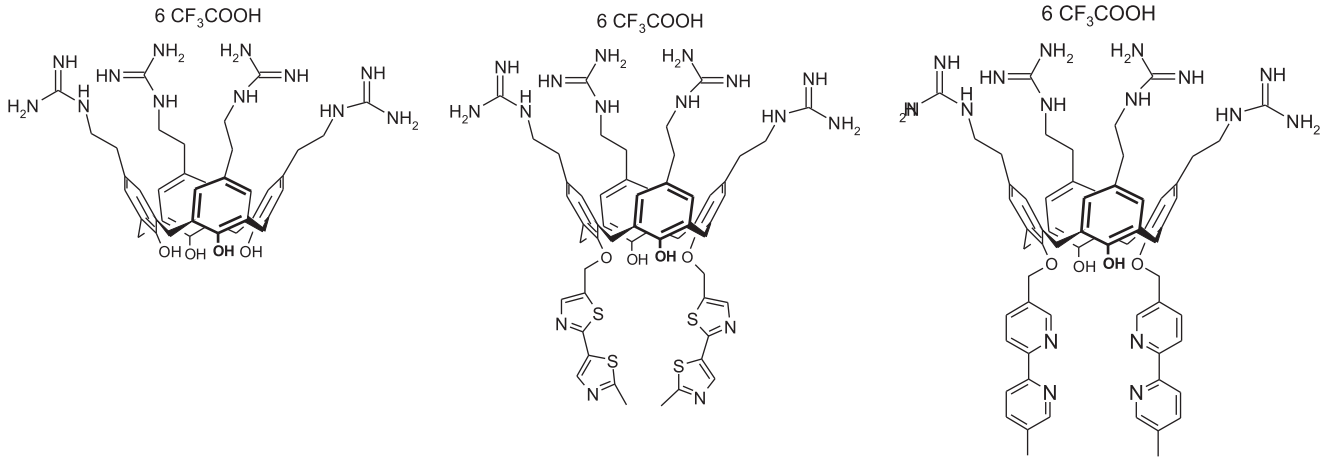
13a,b

$R = O(CH_2CH_2O)_nC_2H_5$

a: n = 12.5

b: n = 60.0

Схема 10



6 **14** **15**

Схема 11

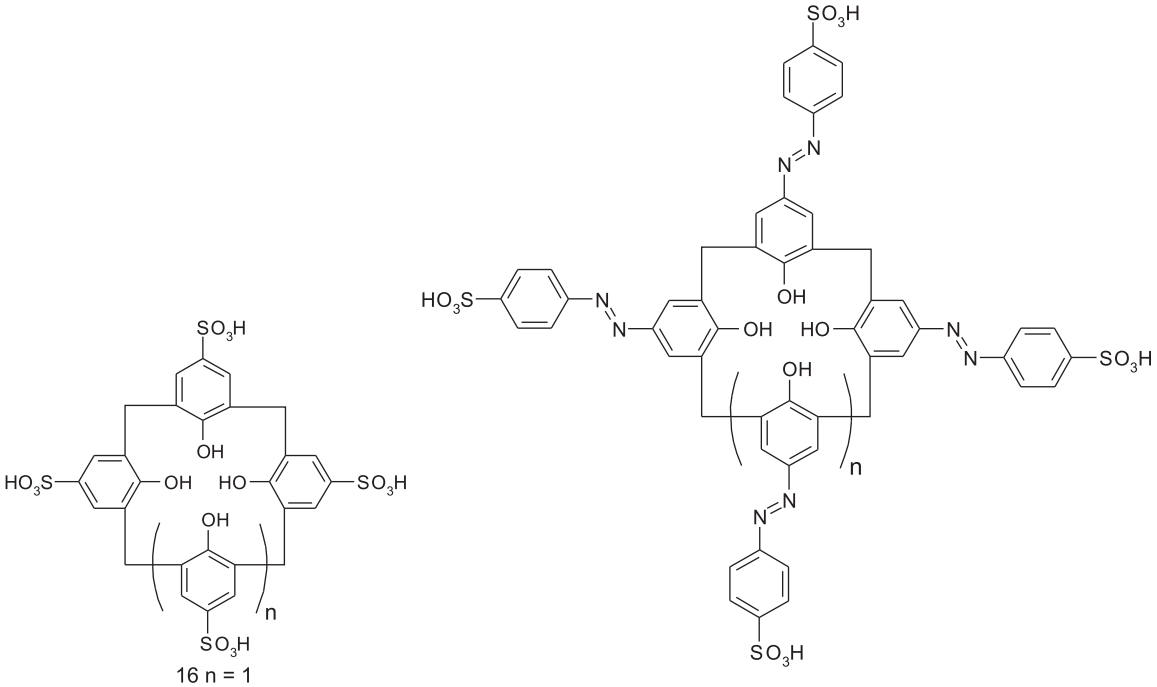
Таблиця 5

МІК для тетрагуанідинокаліксаренів **10-12** та сполук порівняння проти двох штамів *M. tuberculosis*

Сполука	$H_{37}Rv$		MYC1565	
	мг/л	мкМ	мг/л	мкМ
6	1,0	0,8	1,0	0,8
14	2,69	1,6	0,17	0,1
15	1,51	0,8	0,75	0,4
Ізоніазид	0,8	2,5	1,7	12,5
Ципрофлоксацин	0,08	0,6	0,8	2,5

Метил- та адамантилімідазолієві тетракатіонні каліксарени **20-22** показали помірну фунгіцидну активність проти дріжджового гриба *Candida tenius*, але низьку стосовно цвільового гриба *Aspergillus niger* [42]. Автори визначили мінімальну фунгістатичну та мінімальну фунгіцидну концентрації (МФсК та МФцК відповідно, табл. 6), але даних стосовно механізму дії запропоновано не було (схема 13).

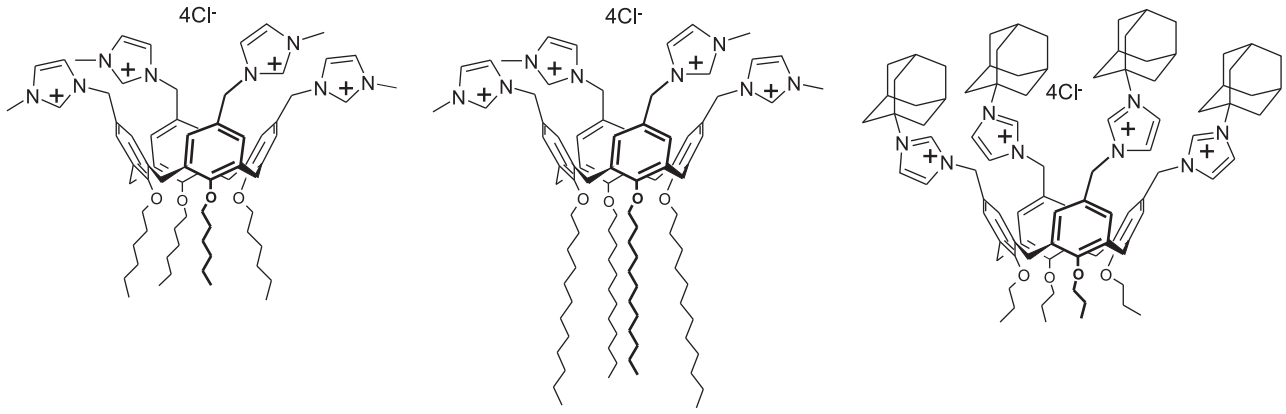
Синтезовані та досліджені кон'югати каліксаренів з чотирма залишками амфотерицину Б (АмБ) **23а,б** [43]. Дані каліксарени знаходяться у конформації конус, що копіює структуру трансмембранної пори. Протигрибкова активність кон'югатів **23** є близькою або вищою за АмБ зі значеннями МІК 0,1 та 0,25 мкМ відповідно (табл. 7) (схема 14).



16 n = 1
17 n = 3
18 n = 5

19 n = 3

Схема 12



20 **21** **22**

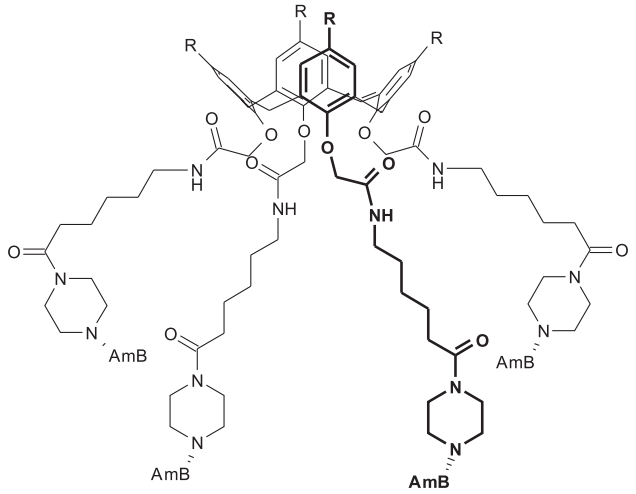
Схема 13

Таблиця 6

Показники МФсК та МФцК каліксаренів **20-22**, отримані методом серійних розведень

Сполука	Candida tenius		Aspergillus niger	
	МФсК, мг/л	МФцК, мг/л	МФсК, мг/л	МФцК, мг/л
20	15,6	62,5	250,0	–
21	62,5	125,0	–	–
22	31,2	125,0	250,0	–

Кон'югати **23** здатні викликати вихід іонів калію з везикул, що свідчить про формування ними каналів у мембранах відповідної товщини. Така здатність властива і самому амфотерицину, отже автори вважають, що саме цим пояснюється фунгіцидна дія каліксаренів **23**. В той же час токсичність каліксаренів є на порядок меншою, ніж у амфотерицину.



23a,b
a: R = H
b: R = t-Bu

Схема 14

Таблиця 7

МІК та EH_{50} значення для АмБ та каліксаренів **23а,б**

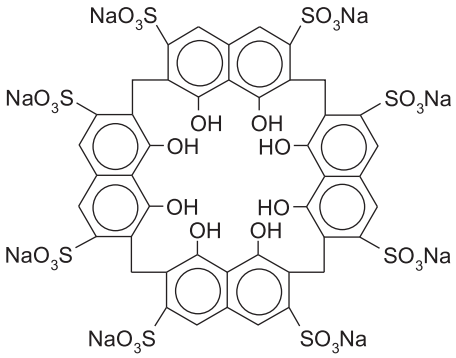
Сполука	МІК BY4741, мкМ	EH_{50}, мкМ
АмБ	0,30	4,0
23а	0,10	50
23б	0,25	40

BY4741 – *S. cerevisiae* клітинна лінія; EH_{50}: концентрація, яка викликає 50% виходу гемоглобіну з еритроцитів людини.

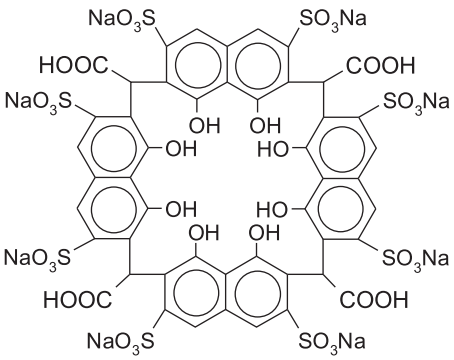
4. Противірусна активність

На теперішній час в якості противірусних засобів найчастіше використовуються аналоги нуклеозидів. Ці сполуки пригнічують реплікацію вірусів завдяки інгібуванню ферментів, необхідних для дозрівання нуклеїнових кислот, або утворюючи спотворений вірусний геном, що викликає дочасне припинення реплікації ДНК вірусів. В інших випадках противірусна терапія базується на блокуванні попадання вірусів у клітину, порушенні синтезу протеїнів на рибосомах клітини-хазяїна, зв'язуванні вірусної ДНК або РНК та імуномодуляції.

Каліксареноподібні похідні хромотропної кислоти **24** та **25** були запатентовані як ефективні противірусні агенти [44]. Ці сполуки є ефективними інгібіторами проникнення в клітину так званих Enveloped viruses, тобто вірусів що мають додаткову оболонку (суперкапсид), яка складається з фрагментів мембран клітини-господаря та глікопротеїнів вірусу. Вивчення зв'язування макроциклів **24** та **25** з вірусними частинками, наприклад, з вірусами герпесу свідчить, що противірусна активність пов'язана з адгезією до вірусної оболонки, що унеможливлює прикріплення вірусів до клітин-мішеней. Нездатність каліксаренів **24** та **25** протидіяти інфекції, викликаній безобо-



24



25

Схема 15

лонковими вірусами, підтверджує цей механізм (схема 15).

Каліксарени **24** та **25** були протестовані *in vitro* проти вірусів простого герпесу 1 та 2 (ВПГ-1, ВПГ-2), ВІЛ, вірусів грипу А та Б та людського респіраторного синцитіального вірусу, аденовірусу та риновірусу. Для досліджень використовувались такі клітинні лінії як HEp_2, $HeLaS_3$, H_9 та VERO. Було показано, що каліксарени **24** та **25** ефективно зменшують цитопатичний ефект, що провокують усі оболонкові віруси. Ефективна доза ($ЕД_{50}$) проти ВПГ-1 складає 0,7-2,7 мг/л, проти ВПГ-2 – 1-2,7 мг/л. Ці результати є кращими за результати таких лікарських засобів як ацикловір, ганцикловір, фосфоноформіат та фосфонометоксіетиладенін. Проти вірусу грипу А значення $ЕД_{50}$ сполук **24** та **25** складає 5-7,9 мг/л, а проти ВІЛ (штами $HTLV\text{-}III_B$ та RF-II) $ЕД_{50}$ дорівнює 0,07-0,50 мг/л [45, 46].

Калікс[4]пірогалоларенкарбонові кислоти **26** та **27** теж проявили активність проти ВІЛ-1 та ВІЛ-2. Каліксарен **26** зменшує цитопатичний ефект на 50% при концентраціях 10 та 0,03 мкМ відповідно [47], а каліксарен **27** при 0,5 та 1 мкМ [48-50] (схема 16).

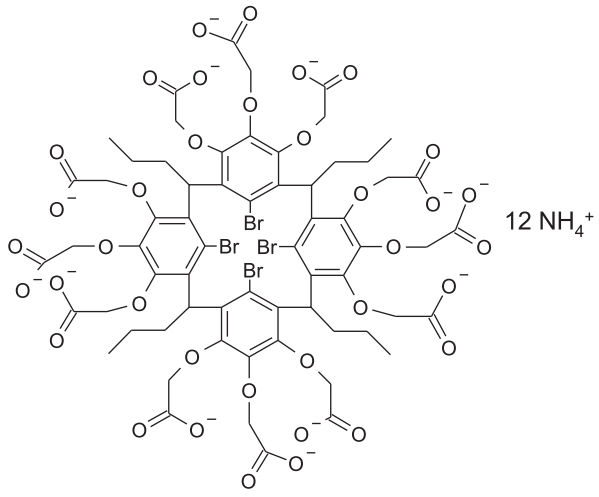
Механізм дії даних каліксаренів описано в загальному виді. Вони інгібують злиття (фузію) вірусу з клітинами-господарями та ферменти-інтегрази вірусів.

Було досліджено дію конусоподібних каліксаренів **28** та **29** з ізо-фталатними групами проти вірусів ВІЛ (штами HIV-IIIB, LaiM184 V, NL-43) та вірусу гепатиту С. Дослідження проводились на різних клітинних лініях, в тому числі на Т-лімфоцитах МТ-2 та CEMx174 та на HeLa клітинах [51] (схема 17).

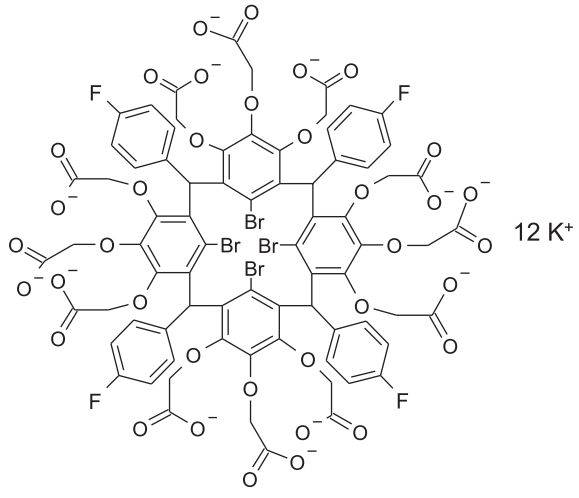
В усіх випадках реєструвалась низька або середня цитотоксичність поряд з високою ефективністю (IC_{50}≥0,3 мкМ, табл. 8). Разом з тим, тетрагідроксикаліксарен **30**, каліксарени **31** та **32** з залишками глютамінової та аспарагінової кислот та макроцикли **33** і **34** із монозахищеними ізофталатними групами показали значно нижчу активність проти обох вірусів (схема 18).

В роботі [52] досліджено противірусну активність катіонних каліксаренів **35** та **36** з фармакофорними адамантильними групами (схема 19).

Активність даних каліксаренів було перевірено проти ВПГ-2, штам ВН, на культурі клітин

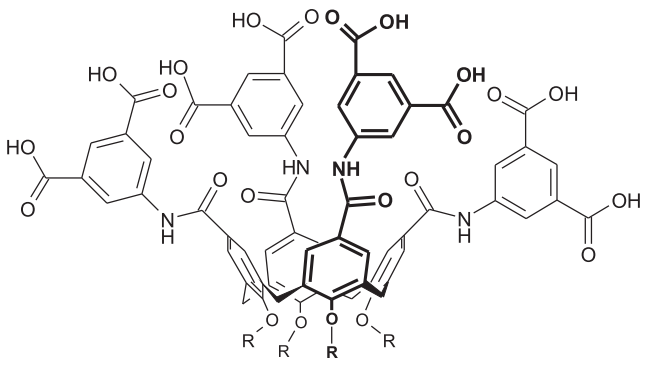


26



27

Схема 16

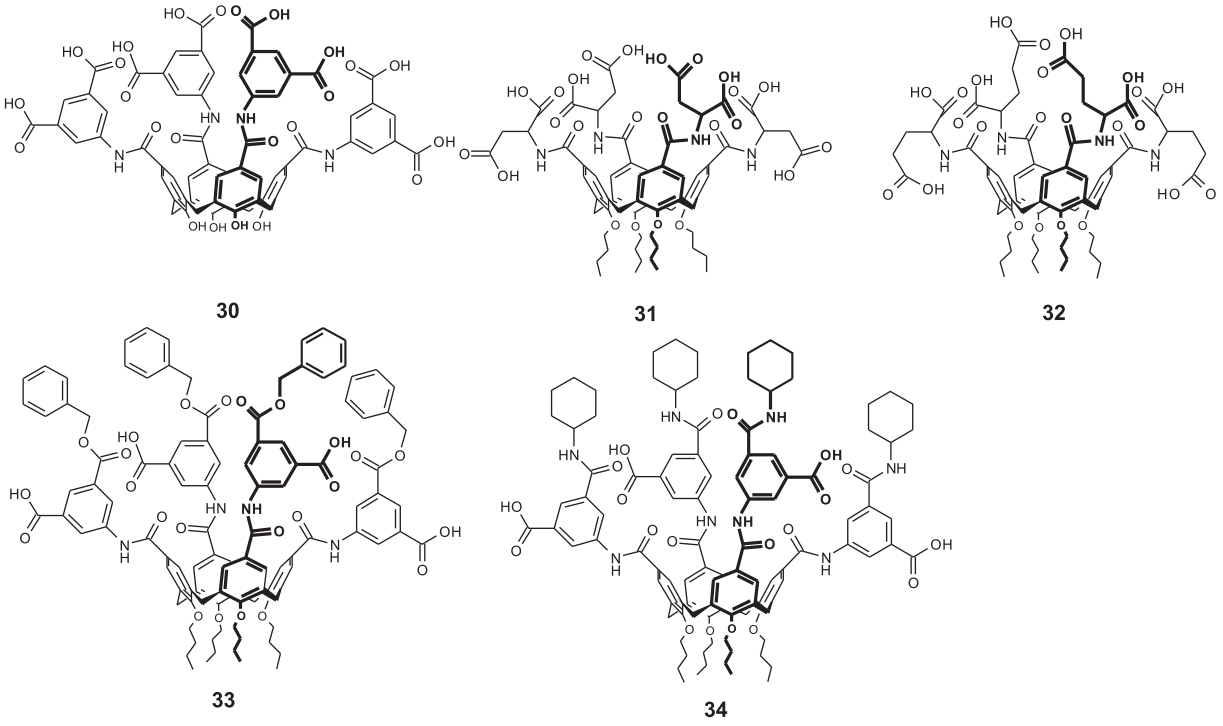


28 R = n-Bu
29 R = Bn

Схема 17

VERO-B. Каліксарен **36** неактивний, в той час як каліксарен **35** показав зменшення цитопатичної дії вірусу при концентраціях 10-125 мг/л. Але його активність менша, ніж у ацикловіру, значення МІК для **35** дорівнює 10 мг/л, для ацикловіру – 0,25 мг/л, хіміотерапевничні індекси 12,5 та 2000 відповідно.

Низка водорозчинних аніонних каліксаренів, функціоналізованих біс-тіазолільними групами, була синтезована та досліджена проти різних штамів ВІЛ [53]. Найбільшу активність проявили тетрасульфонатокаліксарен **38**, тетрафосфонатокаліксарен **39**, тетра- та октакарбоксилатокаліксарени **5** та **37** (табл. 9). Причому саме функціоналізація біс-тіазолільними групами надає даним каліксаренам противірусну активність, вихідні суль-



30 **31** **32**

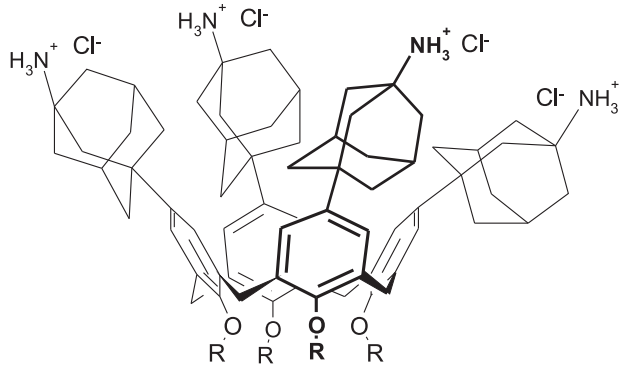
33 **34**

Схема 18

Таблиця 8

Антивірусна активність та цитотоксичність каліксаренів **28-34**

Сполука	Інгібування ВІЛ, IC_{50}, мкМ	Інгібування вірусу гепатиту С, IC_{50}, мкМ	Цитотоксичність, мкМ
28	0,36±0,12	1,8±0,3	>50
29	0,30	1,4	18
30	6,7±2,9	>50	>50
31	3,0±2,8	1,5±0,3	>50
32	2,4±1,4	4,1±1,8	>50
33	>50	25,6	>50
34	>50	4,1	>50



35 R = H
36 R = n-Bu

Схема 19

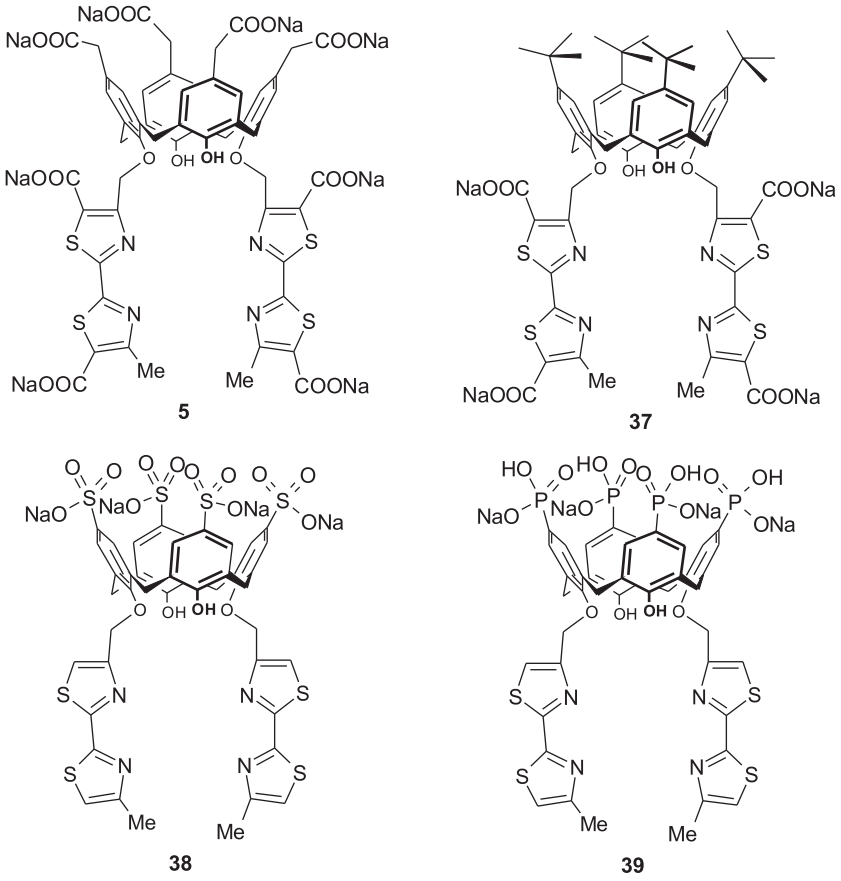


Схема 20

Таблиця 9

Противірусна активність та цитотоксичність аніонних каліксаренів **5**, **37-39**

Сполука	MT4 (HIV-1 IIIB)		CTM-SS (HIV-1 LaI)		PBMC (HIV-1 Bal)	
	IC_{50}, мкМ	цитотоксичність, мкМ	IC_{50}, мкМ	цитотоксичність, мкМ	IC_{50}, мкМ	цитотоксичність, мкМ
5	14	>100	5.3	>100	>37	37
37	15	>100	19.5	>100	14.5	>100
38	1,6	>100	2,2	>100	1,5	>100
39	14	>100	15	>100	57	92
Азидотимідин	0,01	>100	0,0051	>100	0,0077	75

фонато-, ацетато- та фосфонато-тетрагідроксикаліксарени не показали значної активності. Для досліджень використовували три розповсюджені штами ВІЛ-1: IIIB, LAI та Bal, та три лінії Т-лімфоцитів: MT-4, CEM-SS та PBMC (схема 20).

Каліксарен **38**, функціоналізований сульфонатними групами, проявив найбільшу активність проти всіх штамів ВІЛ та незначну цитотоксичність. Але він поступається за ефективністю відомому препарату азидотимідину, який широко використовували у 1990-х та на початку 2000-х років.

Була запатентована противірусна активність натрієвих солей каліксаренів, модифікованих аніонними кобальт-дикарболідними групами. Ці макроцикли здатні інгібувати активність протеази ВІЛ з IC_{50} 91-210 нМ [54].

Висновки

Аналіз великої кількості статей та патентів свідчить, що модифіковані каліксарени проявляють активність проти бактерій, грибів та вірусів. Бактерицидна активність модифікованих каліксаренів зазвичай обумовлюється наявністю декількох позитивно заряджених груп на макроциклічному кістяку. Антивірусна активність зумовлена присутністю від'ємно заряджених угруповань. За активністю каліксаренові похідні переважають такі відомі противірусні препарати, як ацикловір, ганцикловір та фосфонометоксіетиладенін. Фунгіцидну дію каліксарени проявляють при функціоналізації відомими фармакофорними залишками. Особливістю каліксаренів є низька цитотоксичність, їх хіміотерапевтичні індекси переважно ма-

ють значення більше 10. На теперішній час зусилля дослідників спрямовані на встановлення механізмів антимікробної дії та вивчення кореляцій структура-активність біоцидних каліксаренів.

Література

1. *http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/*
2. *Leeds J. A., Schmitt E. K., Krastel P. Expert Opin. Investig. Drugs, 2006, Vol. 15, pp.211-226.*
3. *Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C. Q. J. Appl. Microbiol., 2007, Vol. 104, pp.1-13.*
4. *Zhou M., Luo H., Li Z., Wu F., Huang C., Ding Z., Li R. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2012, Vol. 15, pp.306-315.*
5. *Blondelle S. E., Houghten R. A. Tibtech.1996, Vol. 14, pp.60-65.*
6. *Draggers E. M., Hale S. P., Lee J., Terrett N. Nature, 2008, Vol. 7, pp.608-624.*
7. *Gutsche D. Calixarenes: Synthesis and Historical Perspectives in: Encyclopedia of Supramolecular Chemistry. M. Dekker, 2004, pp.153-160.*
8. *Böhmer V. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1995, Vol. 34, pp.713-745.*
9. *Calixarenes for Separations. Lumetta G. J., Rogers R. D., Gopalan A. S. et al. American Chemical Society, Washington 2000, 366 p.*
10. *Balasahe S., Nimsea T. Kim Chem. Soc. Rev., 2013, Vol. 42, pp.366-386.*
11. *Rodik R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I. Curr. Med. Chem., 2009, Vol. 16, pp.1630-1643.*
12. *de Fatima A., Fernandes S. A., Sabino A. A. Curr. Drug Disc. Tech., 2009, Vol. 6, pp.151-170.*
13. *Helttunen K., Moridi N., Shahgaldian P. Nissinen M. Org. Biomol. Chem., 2012, Vol. 10, pp.2019-2025.*
14. *Casnati A., Fabbi M., Pelizzi N., Pochini A., Francgesco S., Ungaro R., di Modugno E., Tarzia G. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1996, Vol. 6, pp.2699-2704.*
15. *Casnati A., Sansone F., Ungaro R. Acc. Chem. Res. 2003, Vol. 36, pp.246-254.*
16. *Frish L., Sanson F., Casnati A., Ungaro R., Cohen Y. J. Org. Chem., 2000, Vol. 65, pp.5026-5030.*
17. *Sansone F., Baldini L., Casnati A., Lazzarotto M., Ugozzoli F., Ungaro R. PNAS, 2002, Vol. 49, pp.4842-4847.*
18. *Dibama H. M., Clarot I., Fontanay S., Salem A. B., Mourer M., Finance C., Duval R. E., Regnouf-de-Vains J.-B. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, Vol. 19, pp.2679-2682.*
19. *Ben Salem A., Regnouf-de-Vains J.-B. Tetrahedron Lett., 2001, Vol. 42, pp.7033-7036.*
20. *Ben Salem A., Regnouf-de-Vains J.-B. Tetrahedron Lett., 2003, Vol. 44, pp.6769-6771.*
21. *Korchowiec B., Ben Salem A., Corvis Y., Regnouf de Vains J.-B., Korchowiec J., Rogalska E. J. Phys. Chem. B, 2007, Vol. 111, pp.13231-13242.*
22. *Ben Salem A., Sautrey G., Fontanay S., Duval R. E., Regnouf-de-Vains J.-B. Bioorg. Med. Chem. 2011, Vol. 19, pp.7534-7540.*
23. *Mourer M., Fontanay S., Duval R. E., Regnouf-de-Vains J.-B. Helv. Chim. Acta 2012, Vol. 95, pp.1373-1386.*
24. *Grare M., Mourer M., Fontanay S., Regnouf-de-Vains J.-B., Finance C., Duval R. E. J. Antimicrob. Chemother., 2007, Vol. 60, pp.575-581.*
25. *Grare M., Mourer M., Regnouf de Vains J.-B., Finance C., Duval R.-E. Pat. Biol., 2006, Vol. 54, pp.470-476.*
26. *Sautrey G., Orlof M., Korchowiec B., Regnouf-de-Vains J.-B., Rogalska E. J. Phys. Chem. B., 2011, Vol. 115, pp.15002-15012.*
27. *Formosa C., Grare M., Jauvert E., Coutable A., Regnouf-de-Vains J.-B., Mourer M., Duval R., Dague E. Sci. Rep., 2012, Vol. 2, p.575.*
28. *Grare M., Massimba H., Dibama H. M., Lafosse S., Ribon A., Mourer M., Finance C., Regnouf-de-Vains J.-B., Duval R. E. Clin. Microbiol. Infect., 2010, Vol. 16, pp.432-438.*
29. *Mourer M., Dibama H. M., Fontanay S., Grare M., Duval R. E., Finance C., Regnouf-de-Vains J.-B. Bioorg. Med. Chem., 2009, Vol. 17, pp.5496-5509.*
30. *de Namor A. F. D., Cleverley R. M., Zapata-Ormachea M. L. Chem. Rev. 1998, Vol. 98, pp.2495-2525.*
31. *Soomro A. M., Oad R. K., Memon S., Qureshi I. Pak. J. Anal. Environ. Chem., 2012, Vol. 13, No.1, pp.36-39.*
32. *Melezhyk I. O., Rodik R. V., Iavorska N. V., Klymchenko A. S., Mely Y., Shepelevych V. V., Skivka L. M., Kalchenko V. I. Anti-Infective Agents, 2014, in press.*
33. *Birnie C. R., Malamud D., Schnaare R. L. Antimicrob. Agents Chemother., 2000, Vol. 44, pp. 2514-2517.*
34. *Mecca T., Cunsolo F. Tetrahedron 2007, Vol. 63, pp.10764-10767.*
35. *Jain M. K., Jahagirdar D. V. Biochem. J. (Great Britain), 1985, Vol. 227, pp.789-794.*
36. *Hart P. D., Armstrong J. A., Brodaty E. Infect. and Immun., 1996, Vol. 64, pp.1491-1493.*
37. *Hart P. D. Science, 1968, Vol. 162, pp.686-689.*
38. *Colston M. J., Hailes H. C., Stavropoulos E., Herve A. C., Herve G., Goodworth K. J., Hill A. M., Jenner P., Hart P. D., Tascon R. E. Infect. and Immun., 2004, Vol. 72, pp.6318-6323.*
39. *Mourer M., Dibama H. M., Constant P., Daffé M., Regnouf-de-Vains J.-B. Bioorg. Med. Chem., 2012, Vol. 20, pp.2035-2041.*
40. *Psychogio N., Regnouf-de-Vains J.-B. Tetrahedron Lett., 2002, Vol. 43, pp.7691-7693.*
41. *Lamartine R., Tsukada M., Wilson D., Shirata A. C. R. Chimie, 2002, Vol. 5, pp.163-169.*
42. *Saberov V. S., Marichev K. O., Korotkikh M. I., Shvaika O. P., Rodik R. V., Drapailo A. B., Pekhtereva T. M., Komarovska-Porokhnyavets O. Z., Lubenets V. I., Novikov V. P. J. of Organic and Pharmaceutical Chemistry, 2014, Vol. 12, No.2, pp.36-43.*
43. *Paquet V., Zumbuehl A., Carreira E. M. Bioconjugate Chem., 2006, Vol. 17, pp.1460-1463.*
44. *Hwang K. M., Qi Y. M., Liu S.-Y. U. S. Patent US5312837, 1994.*
45. *Hwang K. M., Qi Y. M., Liu S.-Y. U. S. Patent US5196452 1993.*
46. *Hwang K. M., Qi Y. M., Liu S. Y., Choy W., Chen J. WO Patent 9403164, 1994.*
47. *Takeshi Y., Kazuhiro F., Makiko O. Patent of Japan JP10203906A2, 1998.*
48. *Coveney D., Costello B. U. S. Patent 2005113454, 2005, EU Patent EP1367044, 2003.*
49. *Harris S. J. WO Patent 0244121, 2002.*
50. *Harris S. J. WO9519974A2, 1995.*
51. *Tsou L. K., Dutschman G. E. Gullen E. A., Telpoukhovskai M., Cheng Y. C., Hamilton A. D. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010, Vol. 20, pp.2137-2139.*
52. *Motornaya A. E., Alimbarova L. M., Shokova E. A., Kovalev V. V. Pharmaceutical Chemistry Journal (Russian), 2006. Vol. 40, pp.68-72.*
53. *Mourer M., Psychogios N., Laumond G., Aubertin A.-M., Regnouf-de-Vains J.-B. Bioorg. Med. Chem., 2010, Vol. 18, pp.36-45.*
54. *Kral V., Cigler P., Konvalinka J., Kozisek M., Prejdova J., Gruener B., Plesek J., Lepsik M., Pokorna J., Kraeusslich H.-G. Bodem J. WO Patent 2005073240, 2005.*

Надійшла до редакції 12.12.2014 р.

ЗМІСТ / CONTENTS / СОДЕРЖАНИЕ

Ювілей В.П.Черних / To jubilee of V.P.Chernykh 3

METHODS OF SYNTHESIS AND PROPERTIES OF THIAZOLOPYRIDINES / T.I.Chaban 8
Методи синтезу та властивості тіазолопіридинів / Т.І.Чабан
Методы синтеза и свойства тиазолопиридинов / Т.И.Чабан

SYNTHESIS AND THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 1-ALKYL-5-METHYL-3-PHENYL-6-(5-PHENYL-1,3,4-OXADIAZOL-2-YL)THIENO[2,3-*d*]PYRIMIDINE-2,4(1*H*,3*H*)-DIONES / S.V.Vlasov, T.P.Osolodchenko, S.M.Kovalenko, V.P.Chernykh 20
Синтез та антимікробна активність 1-алкіл-5-метил-3-феніл-6-(5-феніл-1,3,4-оксадіазол-2-іл) тієно[2,3-*d*]піримідин-2,4(1*H*,3*H*)-діонів / С.В.Власов, Т.П.Осолодченко, С.М.Коваленко, В.П.Черних
Синтез и противомикробная активность 1-алкил-5-метил-3-фенил-6-(5-фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил) тиено[2,3-d]пиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дионов / С.В.Власов, Т.П.Осолодченко, С.Н.Коваленко, В.П.Черных

PECULIARITES OF INTERACTION BETWEEN 3-(2-AMINOPHENYL)-6-R-1,2,4-TRIAZIN-5(2*H*)-ONES AND CYCLIC ANHYDRIDES OF NON-SYMMETRIC DICARBOXYLIC ACIDS / O.Yu.Voskoboynik, D.Yu.Skorina, S.V.Shishkina, O.V.Shishkin, S.I.Kovalenko, V.V.Ivchuk 25
Особливості взаємодії 3-(2-амінофеніл)-6-R-1,2,4-триазин-5(2*H*)-онів та циклічних ангідридів несиметричних дикарбонових кислот / О.Ю.Воскобойнік, Д.Ю.Скорина, С.В.Шишкіна, О.В.Шишкін, С.І.Коваленко, В.В.Івчук
Особенности взаимодействия 3-(2-аминофенил)-6-R-1,2,4-триазин-5(2*H*)-онов и циклических ангидридов несимметрических дикарбоновых кислот / А.Ю.Воскобойник, Д.Ю.Скорина, С.В.Шишкина, О.В.Шишкин, С.И.Коваленко, В.В.Ивчук

SYNTHESIS AND *IN SILICO* SCREENING OF NOVEL 2-METHYLQUINOLINE-4-ONES BOUND WITH THE PYRAZOL-5-ONES MOIETY / V.O.Zubkov, N.I.Ruschak, O.L.Kamenetska, I.S.Gritsenko 32
Синтез і комп'ютерний скринінг нових 2-метилхінолін-4-онів, зв'язаних з піразолон-5-оновим фрагментом / В.О.Зубков, Н.І.Рущак, О.Л.Каменецька, І.С.Гриценко
Синтез и компьютерный скрининг новых 2-метилхинолин-4-онов, связанных с пиразол-5-оновым фрагментом / В.А.Зубков, Н.И.Рущак, О.Л.Каменецкая, И.С.Гриценко

СИНТЕЗ ТА ГІПОГЛІКЕМІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ 4-ПІРАЗОЛІДЕН-3-КАРБОНОВИХ КИСЛОТ, ЕКЗОФУНКЦІОНАЛІЗОВАНИХ ГІДРАЗИНІЛІДЕН-1,3-ТІАЗОЛІДИНОВИМ ФРАГМЕНТОМ / М.К.Братенко, М.М.Барус, О.М.Денисенко, Р.В.Родік, М.В.Вовк, О.К.Ярош 37
Synthesis and the hypoglycemic activity of pyrazolidene-3-carboxylic acids and their derivatives exo-functionalized with the hydrazinilidene-1,3-thiazolidine fragment / M.K.Bratenko, M.M.Barus, O.M.Denisenko, R.V.Rodik, M.V.Vovk, O.K.Yarosh
Синтез и гипогликемическая активность производных 4-пиразолиден-3-карбоновых кислот, экзофункционализированных гидразинилиден-1,3-тиазолидиновым фрагментом / М.К.Братенко, М.М.Барус, О.Н.Денисенко, Р.В.Родик, М.В.Вовк, А.К.Ярош

SYNTHESIS AND THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF 4-HYDROXY-2,2-DIOXO-1H-2λ^6,1-BENZOTHIAZIN-3-CARBOXYLIC ACIDS TRIFLUOROMETHYL-SUBSTITUTED ANILIDES / L.A.Petrushova, I.V.Ukrainets, S.P.Dzyubenko, L.A.Grinevich 44
Синтез та біологічна активність трифторометилзаміщених анілідів 4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ^6,1-бензотіазин-3-карбонових кислот / Л.О.Петрушова, І.В.Українець, С.П.Дзюбенко, Л.О.Гріневич
Синтез и биологическая активность трифторметилзамещенных анилидов 4-гидрокси-2,2-диоксо-1Н-2λ^6,1-бензотиазин-3-карбоновых кислот / Л.А.Петрушова, И.В.Украинец, С.П.Дзюбенко, Л.А.Гриневич

СТВОРЕННЯ ІННОВАЦІЙНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ (ПІДХОДИ ТА МЕТОДОЛОГІЯ *DRUG DESIGN*) – ОДНЕ З КЛЮЧОВИХ ПИТАНЬ СУЧАСНОЇ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ОСВІТИ / А.П.Крищишин, Д.В.Камінський, Р.Б.Лесик 49
Creation of innovative drugs (approaches and methodology of *drug design*) – one of the main issues of the modern pharmaceutical education / A.P.Kryshchyshyn, D.V.Kaminskyy, R.B.Lesyk
Создание инновационных лекарственных средств (подходы и методология *drug design*) – один из ключевых вопросов современного фармацевтического образования / А.П.Крищишин, Д.В.Каминский, Р.Б.Лесык

НОВІ ПОХІДНІ ГІДРАЗИДУ ІЗОНІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНІ ЗАСОБИ / Н.Б.Гончаренко, В.В.Благодатний, В.В.Ковалішин, І.М.Коперник, О.П.Козаченко, В.С.Броварець, Л.О.Метелиця 59
New derivatives of isonicotinic acid hydraside as potential antitubercular agents / N.B.Goncharenko, V.V.Blagodatnyi, V.V.Kovalishyn, I.M.Kopernyk, O.P.Kozachenko, V.S.Brovarets, L.O.Metelytsia
Новые производные гидразида изоникотиновой кислоты как потенциальные противотуберкулезные средства / Н.Б.Гончаренко, В.В.Благодатный, В.В.Ковалишин, И.Н.Коперник, О.П.Козаченко, В.С.Броварец, Л.А.Метелица

SYNTHESIS AND THE STUDY OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF 2-((5-(PHENOXYMETHYL)-4-R-1,2,4-TRIAZOLE-3-YL)THIO)ETHAN-1-OLS AND THEIR DERIVATIVES / Yu.M.Kucheryavyi, A.G.Kaplaushenko, T.V.Panasenko, A.S.Korzhova, F.Al Zedan 63
Синтез та дослідження фізико-хімічних властивостей 2-((5-(феноксиметил)-4-R-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етан-1-олів і їх похідних / Ю.М.Кучерявий, А.Г.Каплаушенко, А.С.Коржова, Ф.Ал Зедан
Синтез, исследование физико-химических свойств 2-((5-(феноксиметил)-4-R-1,2,4-триазол-3-ил)тио)этан-1-олов, а также их производных / Ю.Н.Кучерявый, А.Г.Каплаушенко, А.С.Коржова, Ф. Ал Зедан

АНТИМІКРОБНА ТА ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ КАЛІКСАРЕНІВ / Р.В.Родік 67
The antimicrobial and antiviral activity of calixarenes / R.V.Rodik
Противомикробная и противовирусная активность каликсаренов / Р.В.Родик